



Louise Mendes Jorge de Oliveira Silva (15/0015569)

Estudo do potencial antiepiléptico do peptídeo neuropolybina, isolado da vespa social

***Polybia paulista*, em canais de sódio voltagem dependentes**

Orientadora: Elisabeth Ferroni Schwartz

Co-orientador: Luis Felipe Santos Menezes

Brasília

2019



Louise Mendes Jorge de Oliveira Silva (15/0015569)

Estudo do potencial antiepiléptico do peptídeo neuropolybina, isolado da vespa social

***Polybia paulista*, em canais de sódio voltagem dependentes**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de graduação em
Farmácia da Universidade de Brasília

Orientadora: Elisabeth Ferroni Schwartz

Co-orientador: Luis Felipe Santos Menezes

Brasília

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por seu incansável amor por mim, por escrever essa história de amor comigo, me permitindo realizar sonhos como esse trabalho e me abençoando infinitamente. Gostaria de agradecer também aos meus pais, Antonia Maria Mendes Jorge e João Batista da Fonseca, por todo esforço na minha educação. Mãe, obrigada por tudo que renunciou em prol da minha educação e dos meus sonhos, por todo carinho, cuidado e paciência, mesmo nas noites em que eu ficava acordada até tarde estudando e atrapalhava seu sono e ainda por todo trabalho que eu dei em todas as vezes que precisou correr para o hospital comigo e cuidou pacientemente de mim. Obrigada, por nunca desistir dos meus sonhos e acreditar neles comigo. Pai, obrigada por todas as vezes que me escutou falar horas sobre a faculdade, até mesmo o que não entendia, mas não deixou de me ouvir. Obrigada, por todo apoio nessa jornada. Eu amo vocês e sou muito sortuda de tê-los. Gostaria de agradecer aos meus avós, Maria do Socorro Mendes Jorge e João Paiva Jorge, por todos os ensinamentos ao longo dos anos, e nesses últimos terem me ensinado muito sobre paciência, em especial a vovó, que é um dos maiores amores que tenho na vida e é minha paciente número um.

Agradeço aos meus padrinhos, Ana Rosa e Luiz Laudenir, por serem exemplo para mim, por tanto amor e carinho, por me ensinarem a acreditar e lutar pela vida, e sobre do que se trata o companheirismo. Deus me presenteia através de vocês todos os dias e em especial todos os domingos passados com vocês. Agradeço aos meus tios, Luiz Genédio e Rosane, por todo carinho e por sempre se interessarem e cuidarem de mim. Ao meu tio Francisco Antônio, por tanto carinho desde pequena. Amo vocês. Agradeço ainda, aos meus primos, todos eles, por todo interesse mesmo que a maioria não entendesse nada do que eu falava. Em especial, Ana Luiza, Déborah, Francisco Augusto, Raíssa e Sara, por serem como irmãos e que sempre me ouviram e acreditaram no amor que eu tenho no que escolhi fazer.

Agradeço a Célia e Júlio Rocha que carinhosamente chamo de tios, que me permitiram fazer perguntas para seu filho Gabriel, meu primo que possui uma síndrome epilética infantil e me ajudou a entender como essa doença de fato acontece em crianças e me inspirou a pesquisar mais sobre o assunto. Obrigada, por acreditarem que o que fazemos pode tornar o mundo um lugar melhor para crianças como ele.

Gostaria de agradecer ao meu amor, meu namorado Fernando, que foi um presente que essa jornada me deu. Obrigada, por sempre ouvir minhas preocupações, me aconselhar, e me acalmar. Obrigada, por acreditar em mim, nos meus sonhos e compartilhá-los comigo, além de me fazer tão feliz. A vida ao seu lado se torna mais leve. Você é o amor da minha vida, eu o amo muito. Agradeço ainda por sua mãe, Rosângela, por todo carinho e cuidado comigo, por cada almoço, doce e lanche preparados com tanto carinho.

Agradeço pela minha orientadora, Elisabeth F. Schwartz, que acreditou em mim e aceitou prontamente ser minha orientadora. Obrigada, por todas as conversas na sua sala sempre disposta a me ouvir e aconselhar. Professora, a admiro muito e sou muito grata por me auxiliar nesse crescimento científico e pessoal. Agradeço ainda ao Luis Felipe, por ter aceitado ser meu co-orientador, por ter sido um amigo e estar sempre disponível para me ajudar e me aconselhar sempre que precisei, por me ajudar a seguir em frente a cada problema e acreditar nesse trabalho. Você me ajudou a crescer científica e pessoalmente, muito obrigada.

Agradeço ao Leandro A. Campos, que acreditou no meu potencial e abriu as portas do laboratório e conseqüentemente da área científica para mim. Agradeço a professora Márcia R. Mortari que gentilmente cedeu material para os meus experimentos. Agradeço também ao Diogo Tibery, por todas as vezes que precisei da sua ajuda no laboratório e prontamente me auxiliou e tirou minhas dúvidas, por todas consultorias, pelos biscoitos e

cafés que fez, além da companhia de bancada. Agradeço aos demais colegas de laboratório que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho e tornaram-se amigos.

Agradeço aos meus amigos de faculdade, em especial a Andressa Vargas e Francielle Lopes que sempre tiraram um pouquinho do seu tempo para me ouvir, almoçar comigo e dividir as angústias que a faculdade nos trouxe, vocês foram verdadeiros presentes que a UnB me deu e mudaram a minha vida, muito obrigada. Agradeço ao Vinícius Caetano, meu amigo de escola e faculdade que sempre se fez presente e um ótimo conselheiro. Agradeço ao meu fiel amigo de infância, Lucas Farias, que sempre perguntou sobre o meu trabalho e me permitia falar horas a fio sobre, sempre se interessando no que eu estava fazendo. A minha melhor amiga, Marina Grigório, que pacientemente entendeu todas as minhas ausências durante esse processo, mas se fez presente sempre que pôde e acreditou em todos os meus projetos desde nossos dez anos, muito obrigada. Agradeço as minhas amigas Isabelle Christine, Ana Helena, Amanda Marinho por todos esses anos de amizade, por terem tanto carinho e me darem apoio nesse trabalho. Aos meus amigos desde o colégio, Caio Cardoso, Karoline Bezerra, Lucas Léon, Lucca Benedetti, Marcus Henrique e Victor Matheus, que sempre acreditaram no meu potencial e me deram total apoio durante a vida universitária.

RESUMO

A epilepsia é uma doença cerebral que afeta cerca de 50 milhões de pessoas no mundo segundo a Organização Mundial de Saúde, caracterizada pela recorrência de crises epiléticas, e sintomas subjetivos como: perda de consciência, rigidez, espasmos, déjà vu, causadas por uma atividade neuronal excessiva ou por uma sincronia anormal no cérebro. Uma das causas mais frequentes de epilepsia genética são mutações nos canais de sódio dependentes de voltagem (VGSC), estruturas essenciais para função neurológica normal, eles são responsáveis pela iniciação e propagação do potencial de ação nas células nervosas. As mutações clinicamente mais importantes na epilepsia geralmente ocorrem no gene SCN1A que codifica o canal Nav 1.1. Frequentemente toxinas isoladas de animais e plantas, principalmente aqueles que possam auxiliar no desenvolvimento ou se tornarem fármacos, são estudadas. O peptídeo neuropolybina isolado da peçonha da vespa social *Polybia paulista* foi testado anteriormente em ratos e camundongos, tendo sido observados efeitos protetores. Desta forma, este trabalho buscou compreender se os VGSC eram alvos farmacológicos desse peptídeo. Os testes eletrofisiológicos (*patch-clamp*) foram feitos em uma concentração de 50 μ M em canais Nav 1.1, onde a ativação com pré pulso e inativação foram influenciadas pela toxina deslocando a curva para a esquerda, ou seja, para um potencial mais negativo. Já a fração não inibida da corrente, ativação sem pré pulso e recuperação da inativação lenta não foram afetadas pela neurotoxina. Entretanto a concentração ainda precisa ser adequada para a elucidação dos seus mecanismos nos VGSC, bem como se há atividade nos demais subtipos.

Palavras-chave: epilepsia, canais de sódio voltagem dependentes, neuropolybina

ABSTRACT

Epilepsy is a chronic cerebral disease affecting around 50 million people throughout the world, according to World Health Organization, being characterized by recurrence of short epileptic seizures that may show symptoms as loss of consciousness, rigidity and spasms déjà vu. Those symptoms can be caused by excessive neuronal activity or even abnormal brain synchrony. One of the most frequent causes of genetic epilepsy are mutations in voltage gated sodium channels (VGSC), essential structures to normal neurological function being responsible to initiate and propagate action potential in nerve cells. The majority of important clinical mutations commonly occurs in gene SCN1A that codes channel Nav1.1. Even more isolated toxins from animals and plants are receiving attention, especially those capable of leading to creation of drugs. The peptide neuropolybina, isolated from social wasp *Polybia paulista*, was previously tested in rats and mice. Due to protective effects it showed, this work aimed to comprehend if VGSC were indeed its pharmacological target. Electrophysiological tests (patch-clamp) were realized with 50 μ M concentration in Nav1.1 channels that already showed pre pulse activation and inactivation influence due to toxin moving those curves to a more negative potential. In the uninhibited current fraction, pre pulse and inactivation recovery haven't been affected by the neurotoxin. However, this concentration yet needs to be adequate to elucidate its functioning mechanisms in VGSC and as well activity in other channel subtypes.

Key words: epilepsy, voltage gated sodium channels, neuropolybina

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	METODOLOGIA.....	27
3.	RESULTADOS	30
4.	DISCUSSÃO	35
5.	CONCLUSÕES.....	39
6.	ANEXOS	40
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

Índice de Ilustrações

QUADROS:

Quadro 1. Classificação de Crises Epilépticas feita pela ILAE em 2017 (FISHER e colab., 2017).....	14
Quadro 2. Glossário de termos classificatórios (BRODIE e colab., 2018; DEVINSKY e colab., 2018)	15

TABELAS:

Tabela 1. Internações no Brasil por epilepsia no SUS de janeiro de 2008 a dezembro de 2018.	16
Tabela 2. Componentes da solução de banho extracelular	27
Tabela 3. Componentes da solução intracelular da pipeta.....	28
Tabela 4. Fração não inibida da corrente (I_{Na}) com e sem pré pulso. Média das células utilizando valores de corrente máxima de cada célula e seu respectivo erro padrão.	30
.....	31
Tabela 5. $V_{1/2}$ da fase de ativação dos canais de sódio voltagem dependentes com pré pulso e sem pré pulso e seus respectivos erros padrões. Toxina: 50 μ M. Possui diferença estatística (*)	32
Tabela 6. Valores de tau da inativação lenta e seus respectivos erros padrões. Toxina: 50 μ M.	33

FIGURAS:

Figura 1. Representação de um canal de sódio voltagem-dependente com as subunidades α e β . Na imagem, é possível visualizar os quatro domínios da subunidade α e seus seis segmentos, além dos loops intra e extracelulares e seu N-terminal e C-terminal. É possível

ainda observar o motivo Imunoglobulina das subunidades β e os locais de interação com a subunidade α . Retirado de (HULL e ISOM, 2018) com modificações.	21
Figura 2. Gráfico de corrente (I)/voltagem (V) com pré pulso (A) e sem pré pulso (B). Média das células com a corrente normalizada Preto: controle; Vermelho: Toxina (50 μ M).	31
Figura 3. Traços brutos da corrente de sódio com pré pulso (A) e sem pré pulso (B). Utilizando valores de corrente máxima da célula. Preto: controle; Vermelho: Toxina (50 μ M).	31
Figura 4. Gráficos do shift de voltagem ou probabilidade de abertura na etapa de ativação, com (A) e sem pré pulso (B) dos canais de sódio voltagem dependentes Nav1.1 testados. Construídos a partir da função de Boltzmann. Preto: controle; Vermelho: toxina (50 μ M).	32
Figura 5. Gráfico do shift de voltagem ou probabilidade de abertura na etapa de inativação do canal de sódio voltagem dependente testado. Gráficos construído a partir da função de Boltzmann. Preto: controle; Vermelho: toxina (50 μ M).	33
Figura 6. Figura 6. Gráfico da recuperação da inativação lenta do canal de sódio voltagem dependente testado. Gráfico construído a partir da função de ExpDec1. Preto: controle; Vermelho: toxina (50 μ M).	34

1. INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma doença cerebral caracterizada por uma pré-disposição duradoura de gerar crises epiléticas tendo consequências sociais, cognitivas e psicológicas (FISHER e colab., 2014). Uma crise epilética possui sintomas objetivos e subjetivos, causadas por uma atividade anormal excessiva ou sincrônica no cérebro (DEVINSKY e colab., 2018).

A causa da epilepsia em muitos pacientes ainda é desconhecida, uma vez que convulsões podem ser resultado de diversas perturbações da função cerebral (DEVINSKY e colab., 2018). Em 2017 a Liga Internacional Contra a Epilepsia (Internacional League Against Epilepsy – ILAE), realizou uma revisão para a realização do diagnóstico da doença e classificação das crises epiléticas. Tal classificação passa por três níveis, sendo o primeiro o tipo de convulsão apresentada pelo paciente, onde serão descartados outros eventos que não se correlacionem. Após essa classificação é possível dizer qual tipo de epilepsia, bem qual síndrome epilética possivelmente o indivíduo apresenta. A síndrome epilética é o conjunto das características clínicas apresentadas, sinais e sintomas, formando um distúrbio distinto e reconhecível (VALETA, 2017). Além disso, quando possível, é importante classificar a etiologia, de acordo com os meios disponíveis, pois é um fator que pode influenciar no tratamento (FISHER e colab., 2017; SCHEFFER e colab., 2017).

Atualmente a ILAE reconhece seis etiologias para a doença, sendo elas: estrutural, genética, infecciosa, metabólica, imune e desconhecida (SCHEFFER e colab., 2017). Embora, na maioria das vezes o diagnóstico seja muito baseado no tipo de convulsão apresentada, a etiologia deve ser levada em consideração pois é uma grande determinante para o tratamento, prognóstico e curso clínico da epilepsia (SHORVON, 2011). Apesar de haver um grupo “desconhecido” esse tem se tornado cada vez menor, já que há mais possibilidades de exames e tecnologias à disposição o que tem facilitado tal classificação (BRODIE e colab., 2018). A classificação etiológica não é hierárquica e um paciente pode

ser classificado em mais de um grupo, por exemplo, se ele apresenta a doença por uma anormalidade estrutural causada por um distúrbio genético, é classificado nos dois grupos (SCHEFFER e colab., 2017).

Existe ainda casos de convulsões febris, que ocorrem durante a infância tipicamente dos 6 meses até os 5 anos de idade associadas a uma febre maior que 38°C e que não tenham evidencia de nenhuma causa intracranial, como infecções, traumas, ou epilepsia já diagnosticada (LEUNG e colab., 2018). Entretanto, a epilepsia também pode ser considerada uma convulsão febril quando a primeira crise ocorre durante uma momento em que o indivíduo está com doença febril sistêmica, além disso, pacientes que tiveram convulsões febris estão mais propensos ao desenvolvimento de epilepsia (LEE e colab., 2016).

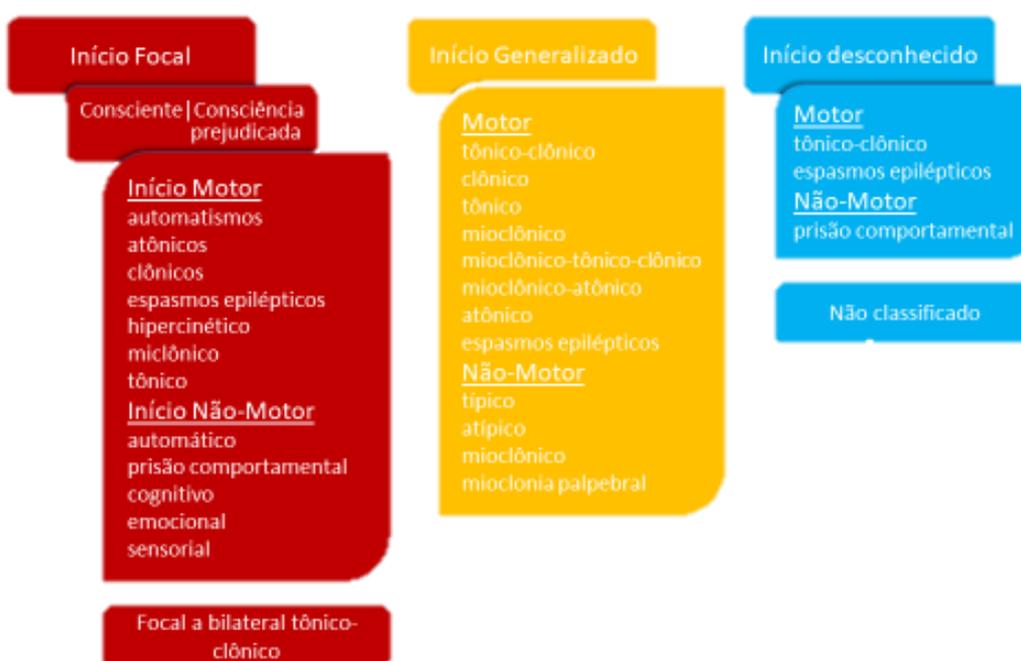
As crises podem ser classificadas em: focal, generalizada ou indeterminada (FISHER, 2017). A crise de início focal é caracterizada pelo início da atividade neuronal anormal que surge em uma região limitada a um hemisfério. Podem ser localizadas ou distribuídos, e originar-se em estruturas subcorticais. Já a crise generalizada é quando a atividade neuronal anormal é distribuída bilateralmente nos hemisférios e se espalha rapidamente, incluindo estruturas corticais e subcorticais, ainda podem ser assimétricas (BERG e colab., 2010). A crise de início desconhecido é quando há características motoras ou não motoras, mas com os dados disponíveis o clínico não é capaz de identificar se o início é focal ou generalizado (FISHER e colab., 2017).

Além disso, nas crises focais o indivíduo pode estar consciente ou inconsciente, e ainda pode ser classificada como motora, quando apresenta contrações musculares, por exemplo, ou não motora, quando não há sinais motores (BRODIE e colab., 2018). Já indivíduos que apresentam crises generalizadas não costumam ser caracterizados quanto ao

seu nível de consciência, pois essa quase sempre é prejudicada, mas seguem sendo classificados em crises epiléticas motoras e não motoras (FISHER, 2017).

Ainda existem outros níveis de classificação das convulsões, de acordo com a ILAE demonstrado no quadro 1. Alguns termos presentes no quadro 1 estão definidos no quadro 2.

Quadro 1. Classificação de Crises Epiléticas feita pela ILAE em 2017 (FISHER e colab., 2017)



Quadro 2. Glossário de termos classificatórios (BRODIE e colab., 2018; DEVINSKY e colab., 2018)

Glossário	
<p>Crises Atônicas Perda súbita do tônus muscular que dura alguns segundos, podendo afetar cabeça, corpo, braços e pernas.</p> <p>Automatismo Comportamentos inconscientes, como mexer as mãos, estalar os lábios, frequentemente seguido de amnésia.</p> <p>Crises Clônicas Movimentos musculares simétricos ou assimétricos rítmicos.</p> <p>Espasmos epilépticos Flexão repentina ou extensão muscular do tronco, podendo incluir caretas, acenos de cabeça e movimentos dos olhos.</p>	<p>Crises Hipercinéticas Intensa atividade motora, como movimento de pedalar as pernas.</p> <p>Crises Mioclônicas Contrações musculares repentinas, rápidas e involuntárias que podem resultar inclusive em quedas.</p> <p>Crises Tônicas Contrações musculares que são sustentadas por alguns segundos ou minutos.</p> <p>Crises Tônico-clônicas Possui uma fase tônica, onde há uma contração muscular inicial que causa a queda do paciente e em seguida vem a fase clônica com movimentos musculares rítmicos.</p>

A prevalência da epilepsia no mundo é estimada em 6,38 a cada 1000 pessoas (IC 95% 5,57-7,30), sua incidência é de aproximadamente 61,44 a cada 100.000 pessoas/ano (IC 95% 50,75-74,38) (FIEST e colab., 2017). Estima-se que cerca de 80% dos casos de epilepsia esteja nos países de baixa ou média renda, onde as taxas de prevalência e incidência são mais altas do que nos países de alta renda (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

Aproximadamente cinquenta milhões de pessoas no mundo tem epilepsia (OMS, 2019), sendo que cerca de cinco milhões estão na região das Américas, o que a torna uma das doenças neurológicas mais comuns (OPAS, 2018), sendo que desses cerca de três milhões são brasileiros (CONITEC, 2018).

Segundo dados disponíveis na seção de Epidemiologia e Morbidade do Departamento de Informática do SUS (DATASUS), de janeiro de 2008 a dezembro de 2018 foram internados 542.141 pacientes com Classificação Internacional de Doenças (CID-10)

registrado como epilepsia. Os maiores números foram encontrados na região sudeste, seguido pelas regiões sul e nordeste.

Tabela 1. Internações no Brasil por epilepsia no SUS de janeiro de 2008 a dezembro de 2018.

Região	Internação
Norte	27.424
Nordeste	105.805
Sudeste	248.789
Sul	116.041
Centro-Oeste	44.082
Total	542.141

Um dos maiores problemas da doença são os estigmas associados à ela. Estima-se que mais de 50% das pessoas que convivem com epilepsia na América Latina e Caribe não tenham acesso a serviços para o tratamento adequado (OPAS, 2011). Até os anos 1970, nos Estados Unidos, a legislação possibilitava a proibição de que pessoas epiléticas frequentassem restaurantes, teatros, centros de recreação e outros prédios públicos. No Reino Unido e Irlanda do Norte até 1971 era permitido a anulação de casamentos caso um dos cônjuges tivesse epilepsia. Na China e Índia a doença ainda é vista como um motivo para proibir ou anular casamentos (OMS, 2019).

O diagnóstico é baseado em evidências clínicas já apresentadas da doença, sendo elas: pacientes com duas ou mais crises não provocadas ou reflexas com um intervalo menor que 24 horas, ou com uma crise não provocada ou reflexa com uma chance maior ou igual de 60% que ocorra uma nova crise nos próximos dez anos (FISHER e colab., 2014).

É muito importante realizar diagnóstico diferencial de outras condições que podem levar a convulsões antes de afirmar que o paciente realmente teve uma crise epilética, casos em que torna-se importante uma testemunha ocular, para que sejam melhores descritas as características da crise apresentada (SCHEFFER e colab., 2017). Dessa forma, é necessário determinar se a crise não foi provocada, reflexa (como em resposta a luzes), ou sintomática

aguda (quando ocorre dano sistêmico ou cerebral como abstinência de álcool, drogas, infecção ou lesão do sistema nervoso central); depois, é preciso avaliar se o paciente que se enquadrou nos parâmetros descritos acima possui epilepsia (DEVINSKY e colab., 2018).

Para auxiliar no diagnóstico da epilepsia é utilizado o EEG que equivale a uma investigação laboratorial em que é possível identificar descargas anormais com perfil epilético, além de ser uma ferramenta muito utilizada também para determinar a classificação de crises epiléticas (KOUTROUMANIDIS e colab., 2017). Entretanto, um resultado normal em um EEG não descarta um diagnóstico de epilepsia, bem como um resultado anormal não garante que o paciente possui a doença (DEVINSKY e colab., 2018).

A Ressonância Magnética (RM) é a principal ferramenta de imagem utilizada atualmente na epilepsia, principalmente em casos de resistência medicamentosa e na avaliação para tratamento cirúrgico quando necessário, e também detecta cerca de 14 a 35% de lesões epileptogênicas em pacientes com crises não provocadas recentemente diagnosticados (HAKAMI e colab., 2013).

A Tomografia Computadorizada (TC) também é utilizada como diagnóstico de imagem, pois há uma facilidade maior de acesso do que à RM, entretanto, não é tão boa para visualização de lesões epileptogênicas, além de uma maior exposição à radiação (DEVINSKY e colab., 2018).

No Brasil o diagnóstico, de acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) emitido pela Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (CONITEC) em 2018, é feito clinicamente através do histórico detalhado e exame físico focado na área neurológica e psiquiátrica, que ainda ressalta a importância de uma testemunha ocular para detalhar as crises. O PCDT preconiza que os exames complementares devem ser guiados pelos achados clínicos e exame físico. O principal exame

é o EEG, que vai auxiliar a estabelecer o diagnóstico de maneira mais certa, pois este é capaz de identificar o tipo e a localização da atividade e então orientar na classificação da síndrome epilética e na escolha do fármaco antiepilético (FAE).

Ainda podem ser feitos outros exames, de acordo com o PCDT, como Ressonância Magnética do encéfalo ou Tomografia Computadorizada do crânio quando há chances de causas estruturais em pacientes com epilepsias focais, mas são complementares e não essenciais.

Após o diagnóstico é introduzido o tratamento com os FAE que são os principais aliados no tratamento da epilepsia, pois seu objetivo é controlar as crises (CHONG e LERMAN, 2016).

A maioria dos FAEs tendem a afetar canais iônicos ou neurotransmissores e, por essa atividade, nem todo fármaco pode ser utilizado da mesma forma para todos os tipos de epilepsia (KARASIN e KARASIN, 2017; MANFORD, 2017). De maneira geral, os principais mecanismos de ação são: bloqueio de canais de sódio, bloqueio de canais de cálcio, aumento da inibição GABAérgica e glutamatérgica (ROGAWSKI e LÖSCHER, 2004)

Os FAEs são classificados como de amplo espectro, quando podem ser utilizados em qualquer tipo de crise epilética, e de espectro estreito, quando utilizados apenas em crises focais ou tônico-clônicas generalizadas secundárias. No total, atualmente, o FDA possui 23 FAEs aprovados (CHONG e LERMAN, 2016).

Embora haja atualmente uma ampla variedade de medicamentos disponíveis, ainda é observada uma lacuna no tratamento dos pacientes. Nos países de baixa renda, pode haver um déficit superior a 75%, déficit superior a 50% em países de média renda e em menos de 10% em países de alta renda, sendo importante ressaltar ainda que essa lacuna no tratamento

também é observada dentro dos próprios países, principalmente nas áreas rurais onde o acesso aos medicamentos é prejudicado (MEYER e colab., 2010).

No Brasil, o PCDT também guia os profissionais do SUS quanto ao manejo medicamentoso, que deve levar em consideração não somente eficácia, mas também efeitos adversos, tolerabilidade e facilidade de administração. O indicado é que sempre que possível seja feita monoterapia, ou seja, apenas um medicamento, e quando houver falha substituir por outro de primeira escolha, numa segunda falha recomenda-se a tentativa de terapia combinada de dois FAEs.

São recomendados treze FAEs no Protocolo, sendo eles: carbamazepina, clobazam, clonazepam, levetiracetam, etossuximida, fenitoína, fenobarbital, gabapentina, topiramato, lamotrigina, vigabatrina, ácido valproico/valproato de sódio e primidona. Sendo assim, esses medicamentos são disponibilizados de forma gratuita na rede pública de saúde (CONITEC, 2018).

Estima-se que, dependendo do tipo de epilepsia, 60% a 70% dos pacientes respondem bem a terapia medicamentosa, enquanto 30% a 40% se tornam resistentes a essas terapias (KALILANI e colab., 2018). Indivíduos que após tratamento com duas terapias apropriadas e distintas, sejam elas monoterapias ou combinadas não obtiverem melhora são considerados resistentes, caracterizando epilepsia resistente a medicamentos (KWAN e colab., 2009).

Dessa forma, para alguns pacientes as cirurgias podem e devem ser consideradas como forma de tratamento, pois elas podem aliviar e até cessar os sintomas da doença. Entretanto essa ainda não é uma prática muito realizada e bem aceita pela maioria das pessoas (KARASIN e KARASIN, 2017). Além disso, a cirurgia pode trazer alguns riscos a memória do paciente, quando é realizada no lobo temporal, e ainda há risco de declínio cognitivo (BAXENDALE e colab., 2019)

Como visto anteriormente, uma das causas mais frequentes para epilepsia são as causas genéticas. Estas comprometem o funcionamento dos canais de sódio voltagem dependentes (VGSC do inglês *Voltage-gated Sodium Channels*), através de mutações dos genes responsáveis pela expressão dos mesmos, sendo essenciais para função neurológica normal (OLIVA e colab., 2012).

Os canais de sódio voltagem dependentes (VGSC) são os responsáveis pela iniciação e propagação do potencial de ação nas células nervosas bem como nas células musculares (RAGSDALE e colab., 1996). São transmembrana e possuem uma subunidade α de 260 kDa em associação com subunidades β auxiliares de 33-36 kDa (CATTERALL, 1986; CATTERALL e colab., 2010).

Os canais Nav são normalmente ativados endogenamente pela mudança de voltagem da membrana celular (despolarização), abrindo-se em microssegundos – processo chamado de ativação – o que resulta em uma corrente interna de íons de sódio (Na^+), ou seja, influxo desse íons e depois, em milissegundos, convertem em um estado não condutor (inativado) – chamado inativação rápida (MANTEGAZZA e colab., 2010).

A subunidade α possuem toda maquinaria necessária para o funcionamento do canal, pois ela possui o sensor de voltagem e também o filtro de seletividade (CESTÈLE e MANTEGAZZA, 2016). Ainda é composta por quatro domínios homólogos (DI-DIV), cada um possuindo seis segmentos transmembrana (S1-S6) conectados uns aos outros por loops intra e extracelulares. O sensor de voltagem é formado pelos segmentos S4 que são carregados positivamente. Já os segmentos S5 e S6 de cada domínio formam o poro seletivo

do canal (Figura 1) (DEUIS e colab., 2017).

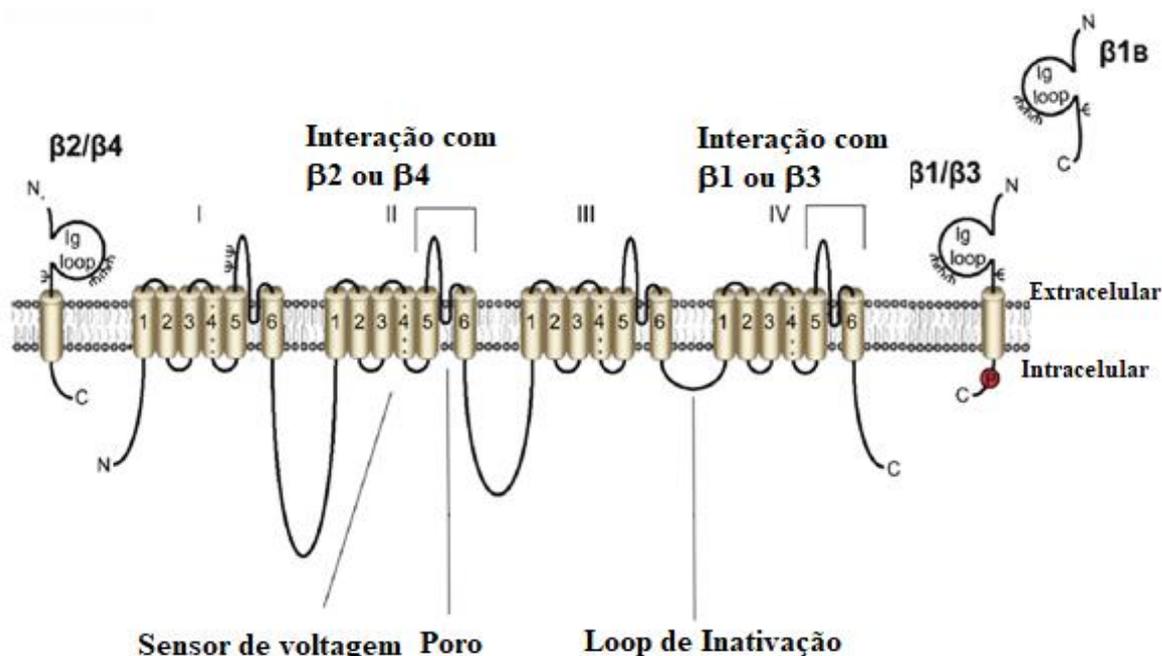


Figura 1. Representação de um canal de sódio voltagem-dependente com as subunidades α e β . Na imagem, é possível visualizar os quatro domínios da subunidade α e seus seis segmentos, além dos loops intra e extracelulares e seu N-terminal e C-terminal. É possível ainda observar o motivo Imunoglobulina das subunidades β e os locais de interação com a subunidade α . Retirado de (HULL e ISOM, 2018) com modificações.

As subunidades β são compostas por um único segmento transmembrana, um único domínio extracelular que contém um motivo imunoglobulina, e um domínio intracelular. A subunidade β interage com a subunidade α através de ligações dissulfeto ($\beta 2$ e $\beta 4$), ou por ligações não covalentes ($\beta 1$ e $\beta 3$) (CATTERALL, 2000; CESTÈLE e MANTEGAZZA, 2016). Por muito tempo as subunidades β foram consideradas meros acessórios das subunidades α por ela conter toda a maquinaria para o funcionamento do canal. Entretanto, essas subunidades conferem características únicas para regulação da excitabilidade celular, nos mecanismos de ação permitindo uma farmacologia diferente no canal, além de possuírem funções que são independentes das subunidades α (HULL et al., 2018). De maneira geral, o canal possui três estados: fechado, aberto e inativo (CATTERALL, 1986). O processo de abertura do canal é o movimento dos sensores de voltagem em resposta a

mudança de voltagem através da membrana, isso resulta em um rearranjo estrutural do canal (CESTÈLE e MANTEGAZZA, 2016). Quando a membrana encontra-se em repouso o canal está fechado, após a despolarização o canal encontra-se aberto e subsequente a abertura encontra-se inativo (RAGSDALE e colab., 1996).

No estado fechado, os quatro sensores de voltagem estão na posição “down” provavelmente porque as cargas positivas dos segmentos S4 faz com que sejam atraídas para o meio intracelular da membrana celular, influenciando no forte potencial elétrico que é gerado pelas cargas negativas da membrana quando em repouso (DEUIS et al., 2017).

Já a despolarização da membrana leva à ativação e uma abertura muito rápida do canal, já que os potenciais de membrana mais positivos permitem que as cargas de fechamento dos segmentos S4 se movam novamente em direção a parte extracelular da membrana, ficando na posição “up” (DEUIS e colab., 2017). Além disso, esse processo pode envolver um movimento como espiral, onde as hélices de S4 deslizam e giram em torno dos seus eixos, e com os resíduos carregados trocando seus pares iônicos até que estejam estabilizados mais uma vez, pela carga negativa altamente conservada nos demais segmentos, e o movimento dos sensores de voltagem é sequencialmente transferido para os domínios do poro por meio de adaptadores S4-S5, isso faz com que haja a alteração conformacional do poro, tornando-o permeável aos íons de sódio (PAYANDEH e colab., 2011, 2012)

A inativação rápida do canal acontece em milissegundos, no terceiro loop intracelular entre os domínios III e IV. O processo é crucial para a repolarização e continuação dos potenciais de ação, entretanto o canal não se encontra fechado, mas inativo e não conduz os íons, para que ele possa se recuperar da ativação e então retornar ao estado fechado em repouso (CESTÈLE e MANTEGAZZA, 2016).

No genoma dos mamíferos, as subunidades α são codificadas pelos genes SCN(1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11)A, e as subunidades β são codificadas pelos genes SCN(1-4)B (CATTERALL e colab., 2005). Os canais Nav possui nove isoformas, classificados de acordo com a subunidade α (Nav 1.1 – 1.9), associado a duas subunidades β ($\beta 1$ – $\beta 4$), formando assim um complexo heterotrimérico que forma um único poro (HULL e ISOM, 2018).

Já foram relacionadas mutações nos quatro genes de VGSC que estão mais distribuídos no Sistema Nervoso Central, SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN8A, que codificam os canais Nav 1.1, 1.2, 1.3 e 1.6, respectivamente – sendo que as mutações clinicamente mais importantes na epilepsia geralmente ocorrem no gene SCN1A, com mais de 1000 mutações identificadas, e tipicamente apresentam perda de função (CARPENTER e SCHORGE, 2018).

Os canais Nav 1.1 é predominante nas regiões caudais e na medula espinhal, sendo encontrado em altos níveis em dendritos e corpos celulares, e também no segmento inicial do axônio de alguns neurônios (ESCAYG e GOLDIN, 2010).

A síndrome de Dravet (SD) é uma das mais associada a mutações no SCN1A, caracterizada por um tipo de encefalopatia epiléptica grave durante a infância, que inicia com aproximadamente 6 meses de idade com múltiplas convulsões que tendem a ser refratárias, sem regressão e não se restringindo apenas a crises epiléticas, mas também a distúrbio do sono, com processamento sensorial alterado, além de anormalidades no deambular do paciente (CARPENTER e SCHORGE, 2018; OLIVA e colab., 2012). As crianças possuem essa mutação em um alelo do gene SCN1A, presente em aproximadamente 70% dos casos, levando a uma perda de função dos canais Nav 1.1, diminuindo a excitabilidade nos interneurônios GABAérgicos (CATTERALL e colab., 2010).

Mutações no SCN1A podem ser encontradas em aproximadamente 50% das crianças que possuem distúrbios que se assemelham a SD, incluindo epilepsia multifocal infantil grave, e epilepsias refratárias da infância resistentes com crises tônico-clônicas generalizadas (HIROSE e colab., 2013), crises migratórias da infância, além de encefalopatias epilépticas menos específicas com crises tônico-clônicas isoladas na infância e crises com predominância occipital (OLIVA e colab., 2012).

Os fármacos carbamazepina (CBZ), fenitoína (PHT), lamotrigina (LTG) modulam os VGSC de maneira dose-dependente e voltagem-dependente, evitando seletivamente o disparo de alta frequência com pouco efeito em um único potencial de ação, tem uma afinidade maior pelo estado inativado do que pelo estado aberto ou fechado do canal, atuam estabilizando o estado inativo, bloqueando efetivamente a condutância dos íons Na^+ , retardando a recuperação da inativação, evitando, portanto, os disparos de alta frequência (QIAO e colab., 2014).

Os VGSC já são alvos farmacológicos e continuam sendo estudados como alvos de toxinas isoladas de animais e plantas, principalmente aqueles que possam auxiliar no desenvolvimento ou se tornarem fármacos (DEUIS e colab., 2017). Diversos peptídeos e proteínas derivadas de peçonhas estão em desenvolvimentos pré-clínicos ou em ensaios clínicos, para diversas aplicações como: câncer, dor crônica, insuficiência cardíaca congestiva, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, esclerose múltipla e também a epilepsia (MONGE-FUENTES e colab., 2015).

O SNC é um alvo importante para essas toxinas, onde é possível modular sinapses e a propagação dos potenciais de ação, além da ação seletiva nos diferentes canais iônicos e receptores, bem como auxiliar na elucidação de mecanismos de doenças e para desenhos de fármacos (SILVA e colab., 2015). Peçonhas de vespas são compostos com uma grande

variedade efeitos farmacológicos, principalmente no SNC, possuindo proteínas, peptídeos, enzimas, aminoácidos, sais inorgânicos e diversas aminas (MORTARI e colab., 2005).

Dois peptídeos com treze resíduos de aminoácidos, chamados α -pompilidotoxina e β -pompilidotoxina, isolados das peçonhas das vespas solitárias *Anoplius samariensis* e *Batozonellus maculifrons*, respectivamente, são ativadores dos canais Nav, com uma alta similaridade. Podendo a β -pompilidotoxina chegar a ser cinco vezes mais potente, e agir no subtipo Nav 1.1 atrasando sua inativação rápida (DEUIS e colab., 2017).

No gênero *Polybia*, destacam-se os compostos da espécie *P. ignobilis* que parece interagir com os receptores de GABA e glutamato, tendo até efeitos antiepilépticos (CUNHA e colab., 2005). De maneira similar compostos da peçonha da *P. occidentalis* foram testados e apresentaram efeito anticonvulsivante, interagindo provavelmente nos receptores de GABA (MORTARI e colab., 2005). Entretanto, em ambos compostos, quando testados frente a crises induzidas por Pentilenotetrazol (PTZ), eles não foram efetivos (SILVA e colab., 2015).

Compostos de baixo peso molecular isolados da peçonha da vespa social *P. paulista* exerceram atividade anticonvulsivante e ansiolítica em modelo animal, inclusive em 60% dos modelos com crise induzida por PTZ, demonstrando um potencial para o estudo de seus compostos mais filtrados (COUTO e colab., 2012).

Em um trabalho realizado por Couto (2012) o peptídeo neuropolybina (Ppnp7) isolado da peçonha da vespa *Polybia paulista* e testado em modelo animal, ratos Wistar, apresentou um efeito protetor contra crises epilépticas induzidas por PTZ, de maneira dose-dependente, sem gerar danos motores.

Em um estudo realizado por Silva (2013) foram feitos testes com o mesmo composto, neuropolybina, e um modificado desse composto em camundongos, onde o não modificado

foi mais eficaz em bloquear crises induzidas por PTZ que o modificado, entretanto nenhum dos dois foi capaz de proteger contra crises induzidas por Pilocarpina. E no mesmo estudo realizado por Silva (2013), a neuropolybina e seu análogo não apresentaram atividade nos testes de neuroquímica realizados para captação de [³H]-L-Glutamato, ou ligação a receptores de [³H]-GABA e [³H]-L-Glutamato em ratos.

Tendo em vista os efeitos observados *in vivo* e a possibilidade do uso farmacológico do neuropeptídeo neuropolybina para a proteção de crises epiléticas, buscou-se com este trabalho compreender os alvos farmacológicos do peptídeo supracitado. Considerando que os VGSC estão intimamente ligados a quadros epiléticos, eles se tornam bons alvos para auxiliar na elucidação do efeito antiepilético já observado.

2. METODOLOGIA

1) Peptídeo

O peptídeo foi sintetizado pela empresa Aminotech Desenvolvimento e Tecnologia Ltda com base na sequência do composto neuropolybina (Ppnp7) obtida por Couto (2012). Possui 1204,34 Da e seu espectro está disponível no Anexo 1.

2) *Patch-clamp*

2.1) Cultura de células

Foram utilizadas células Human Embryonic Kidney 293 (HEK) que expressam a isoforma Nav 1.1. Para os ensaios no *Patch-clamp* as células HEK foram cultivadas em meio de cultura descrito a seguir. As células eram incubadas a temperatura constante de 37°C e atmosfera umedecida com 5% de CO₂.

2.1.1) Meio de cultura

As células HEK foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 1% de aminoácidos não essenciais (MEM), 4,5% de Glicose e antibiótico G418 (0,4mg/mL, Sigma).

2.2) Soluções para registro fisiológico

2.2.1) Solução de banho extracelular

O pH da solução foi ajustado para 7,4 com NaOH.

Tabela 2. Componentes da solução de banho extracelular

	nM
NaCl	130
KCl	5
CaCl ₂ .H ₂ O	2
MgCl ₂ .6H ₂ O	2
HEPES	10
Glicose	10

2.2.2) Solução intracelular da pipeta

O pH da solução foi ajustado para 7,4 com NaOH.

Tabela 3. Componentes da solução intracelular da pipeta

	nM
CsF	105
CsCl	27
NaCl	5
MgCl ₂	2
EGTA	10
HEPES	10

2.3) Ensaio eletrofisiológicos

As células cultivadas contendo a isoforma de Nav 1.1 foram plaqueadas e imersas em solução externa descrita no item 2.2.1 na cubeta de experimentação. Os registros eletrofisiológicos foram feitos em temperatura ambiente no modo *Whole-cell* no aparelho HEKA Patch clamp EPC 10, nesse modo a somatória de correntes de sódio foi registrada (mensuração de macrocorrentes - I_{Na}). Foram confeccionadas pipetas de borosilicato para que essas apresentassem aproximadamente 1,5-2,5 MOhms de resistência, sendo em seguida preenchidas com a solução interna descrita no item 2.2.2. O protocolo de estimulação de voltagem foi feito a partir de um potencial de repouso de -100mV. Já o protocolo aplicado para avaliação da probabilidade de abertura do canal durante a ativação, inativação e inibição de corrente, a célula partia de um potencial de repouso e era estimulada por uma sequência de despolarizações, variando de -100mV a 30mV, durante 30 ms, e também um estímulo final logo após a despolarização, com um pulso de -10mV por 10 ms para avaliação da inativação lenta. Ainda foi avaliado o pré pulso, com 30mV durante 5 ms antecedendo a despolarização. O intervalo entre o pré-pulso e despolarização foi de 50 ms. A resistência em série foi compensada em pelo menos 70%, e as correntes capacitivas foram compensadas

em um protocolo p/4. Para avaliação da recuperação da inativação lenta o protocolo realizado foi com dois pulsos um de -10 mV por 20 ms em 40 ciclos, e a cada ciclo dois milissegundos eram acrescentados, de maneira que o intervalo máximo entre os pulsos foi de cerca de 80 ms.

Os registros foram obtidos pelo amplificador EPC 10 HEKA que é comandado através do *software* PatchMaster. Os protocolos de estimulação avaliaram as relações corrente/voltagem bem como a cinética da inativação lenta na ausência e na presença da neuropolybina na concentração de 50 μ M. Para avaliação do efeito da neuropolybina na condutância de Na⁺ (gNa), picos de INa foram convertidos em condutância pela fórmula (I):

$$g_{Na} = g_{max}^{-1} \left(\frac{1}{(V - V_{Na})} \right) \quad (I)$$

Onde V= voltagem que deflagrou o pico de corrente I e VNa = potencial de reversão de sódio. Para avaliar se a neuropolybina possuía algum efeito de alteração na probabilidade de abertura (shift de voltagem) foi utilizado a equação de Boltzmann (II) e/ou na inibição de macrocorrente (III). Para a equação de Boltzmann temos V_{1/2} sendo o V_{half} e o Kh o fator de inclinação da reta. Para recuperação da inativação lenta o ajuste foi feito pela função exponencial (IV) para obtenção da constante de tempo tau.

$$i = \frac{1}{1 + e^{\{(V - V_{1/2})/kh\}}} \quad (II)$$

$$\text{Fração não inibida (Fu)} = \left(\frac{I/I_{maxToxina}}{I/I_{maxControle}} \right) \quad (III)$$

$$y(t) = Amp_0 + \sum_{i=1}^3 Amp_i \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_i}} \right) \quad (IV)$$

O teste t pareado *two-tailed* foi realizado afim de avaliar se havia diferença estatística entre o grupo controle e após aplicação da toxina.

3. RESULTADOS

O peptídeo neuropolybina isolado da vespa *Polybia paulista* foi sintetizado anteriormente para a realização do trabalho de Silva (2013). Ele apresenta uma massa molecular de 1204,34 Da, com nove resíduos de aminoácidos: Pyr-Gln-Trp-Gln-Pro-Gln-Leu-His-Arg-OH. O composto foi sintetizado pela empresa Aminotech, e o espectro de massa fornecido pela empresa encontra-se no Anexo 1.

Foram realizados testes na isoforma Nav 1.1, com concentração final da toxina de 50 μ M. Os ensaios de ativação e fração não inibida da corrente (Fu) foram realizadas com e sem pré pulso.

Foi avaliada durante a fase de ativação o Fu na presença do peptídeo neuropolybina, entretanto não houve inibição significativa de corrente na presença do mesmo, independente se a ativação ocorreu com ou sem pré pulso, variando de 0,98 a 0,99 (Tabela 4). Não houve diferença estatística.

Tabela 4. Fração não inibida da corrente (Fu) com e sem pré pulso. Média das células utilizando valores de corrente máxima de cada célula e seu respectivo erro padrão.

Fração não inibida da corrente I_{Na^+} (Fu)		
	Média	n
Com pré pulso	0,98 \pm 0,017	4
Sem pré pulso	0,99 \pm 0,009	3

Portanto, não foram observadas inibições das macrocorrentes de sódio, independente da aplicação com ou sem pré pulso da neurotoxina, como é demonstrado nos gráficos de corrente/voltagem (I/V) (Figura 2) e nos traços brutos (Figura 3).

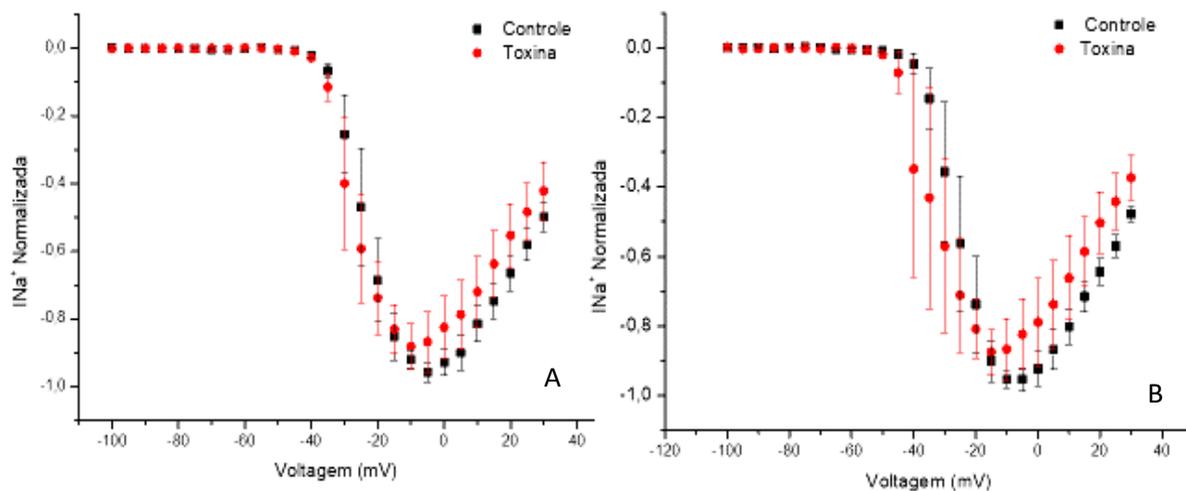


Figura 2. Gráfico de corrente (I)/voltagem (V) com pré pulso (A) e sem pré pulso (B). Média das células com a corrente normalizada Preto: controle; Vermelho: Toxina ($50\mu\text{M}$).

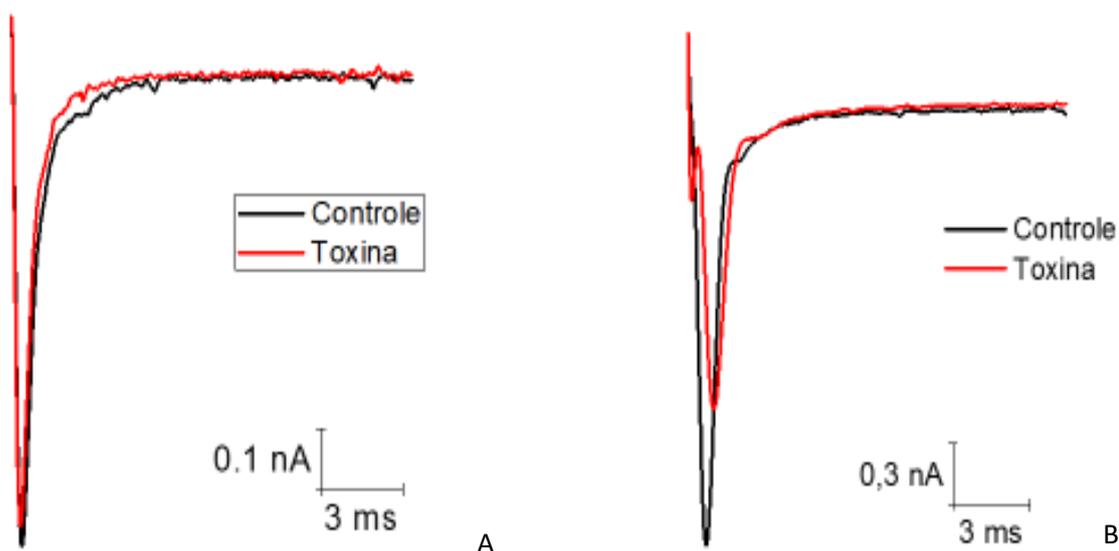


Figura 3. Traços brutos da corrente de sódio com pré pulso (A) e sem pré pulso (B). Utilizando valores de corrente máxima da célula. Preto: controle; Vermelho: Toxina ($50\mu\text{M}$).

Com intuito de avaliar se houve influência da toxina na cinética do canal $\text{Nav} 1.1$, foi analisado o deslocamento da curva de probabilidade de abertura na ativação e na inativação dos canais, tanto na presença como na ausência da neuropolybina, através dos $V_{1/2}$ gerados pela função de Boltzmann (Função II). Não foram observadas alterações significativas para ativação sem pré pulso. Entretanto, para a ativação com pré pulso e inativação foi observada uma variação estatisticamente significativa ($P < 0,05$), deslocando a curva para a esquerda, ou seja, para um potencial mais negativo.

Nos experimentos de ativação com pré pulso, a variação do *shift* de voltagem foi de aproximadamente $-3,67 \pm 1,13$ mV, possuindo diferença estatística ($P < 0,05$), enquanto nos experimentos de ativação sem pré pulso a variação do *shift* de voltagem foi de aproximadamente $-7,11 \pm 2,03$ mV (Tabela 5) (Figura 4). Nos experimentos de inativação a variação no *shift* de voltagem foi de $-1,14 \pm 0,30$ mV ($P < 0,05$) (Tabela 5) (Figura 5).

Tabela 5. $V_{1/2}$ da fase de ativação dos canais de sódio voltagem dependentes com pré pulso e sem pré pulso e seus respectivos erros padrões. Toxina: $50 \mu\text{M}$. Possui diferença estatística (*)

	$V_{1/2}$ Controle (mV)	$V_{1/2}$ Toxina (mV)	$\Delta V_{1/2}$ (mV)	
	Média	Média	Média	n
Com pré pulso	$-22,00 \pm 2,99$	$-25,67 \pm 3,40$	$-3,67 \pm 1,13$	4*
Sem pré pulso	$-22,98 \pm 2,96$	$-31,76 \pm 3,27$	$-7,11 \pm 2,03$	3
Inativação	$-48,42 \pm 1,26$	$-46,99 \pm 1,25$	$-1,14 \pm 0,30$	4*

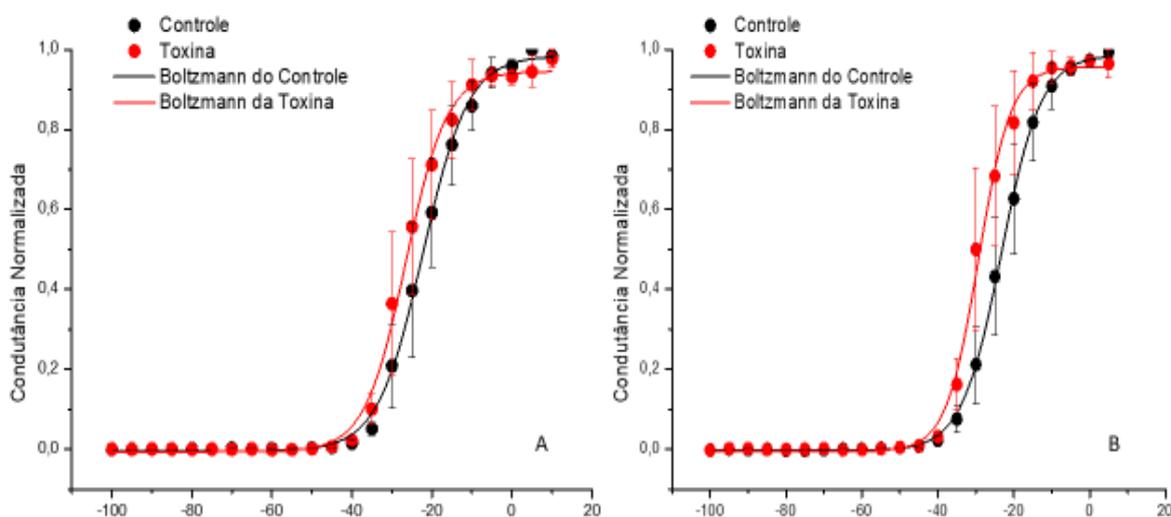


Figura 4. Gráficos do *shift* de voltagem ou probabilidade de abertura na etapa de ativação, com (A) e sem pré pulso (B) dos canais de sódio voltagem dependentes Nav1.1 testados. Construídos a partir da função de Boltzmann. Preto: controle; Vermelho: toxina ($50 \mu\text{M}$).

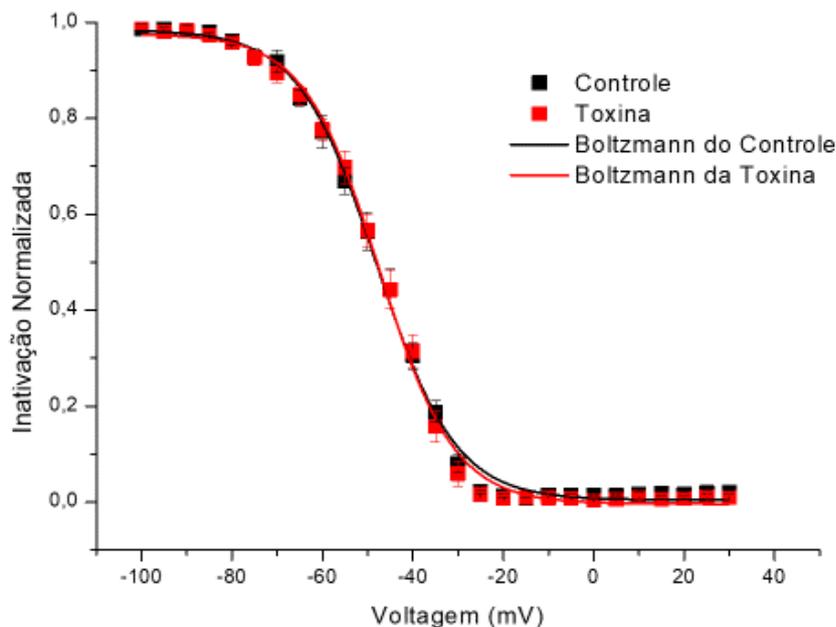


Figura 5. Gráfico do shift de voltagem ou probabilidade de abertura na etapa de inativação do canal de sódio voltagem dependente testado. Gráficos construído a partir da função de Boltzmann. Preto: controle; Vermelho: toxina (50µM).

E por fim, para avaliar se havia interferência da neurotoxina na recuperação da inativação lenta dos canais de sódio, que é o tempo que esses canais necessitam entre um estímulo e outro para passarem do estado inativo para o fechado, o tau foi analisado. Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre controle e na presença da toxina durante a recuperação do canal, a variação foi de $0,04 \pm 0,12$ ms (Tabela 6) (Figura 6).

Tabela 6. Valores de tau da inativação lenta e seus respectivos erros padrões. Toxina: 50µM.

T Controle (ms)	T Toxina (ms)	ΔT (ms)
$2,75 \pm 0,22$	$2,79 \pm 0,10$	$0,04 \pm 0,12$

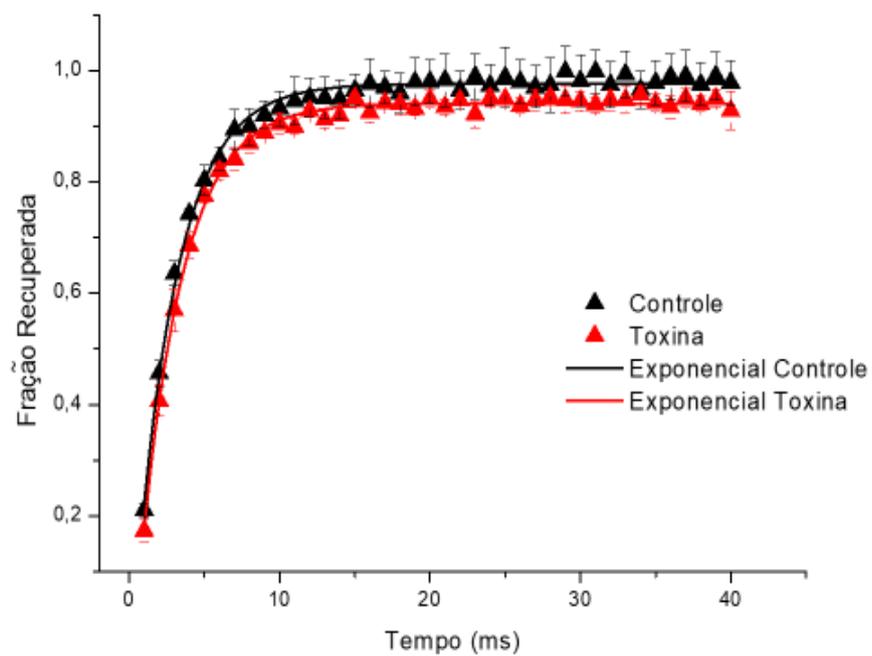


Figura 6. Gráfico da recuperação da inativação lenta do canal de sódio voltagem dependente testado. Gráfico construído a partir da função de $ExpDec1$. Preto: controle; Vermelho: toxina ($50\mu M$).

4. DISCUSSÃO

O peptídeo neuropolybina faz parte dos compostos de baixo peso molecular da peçonha da vespa solitária *Polybia paulista* e até então só havia sido testado em modelos animais, no trabalho de Couto (2012) em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), de Silva (2013) e Gomes (2016) em camundongos Swiss (*Mus musculus*). O presente trabalho foi o primeiro a testá-lo *in vitro* em canais voltagem dependente.

Os compostos de baixo peso molecular da peçonha da vespa *P. paulista* haviam sido testados em conjunto em modelo animal de crises induzidas por PTZ (COUTO e colab., 2012), onde 60% dos animais foram protegidos das convulsões, além de ter se mostrado dose dependente.

No trabalho de Couto (2012), houve a purificação da neuropolybina a partir desses compostos de baixo peso molecular e sequenciamento dos seus resíduos de aminoácidos, mostrando ser um composto linear, e estável, conseqüentemente uma boa opção para ser testada mais uma vez em modelo animal.

Embora, no século XX tenha ocorrido um grande progresso na farmacoterapia da epilepsia com a inclusão de diversos FAEs, um terço dos pacientes ainda é resistente ao que se tem disponível, tornando seu tratamento ainda um constante desafio (LÖSCHER, W. e LEPPIK, 2002). Por isso, moléculas neuroativas de peçonhas, como a do presente trabalho se tornam alvo de investigação, não somente para novos tratamentos, mas também para entender a fisiopatologia da doença e como essa resistência acontece.

No trabalho de Silva (2013), em modelos agudos induzidos por PTZ, 100% dos camundongos foram protegidos, contrastando com o trabalho anterior de Couto (2012) em que os ratos não obtiveram essa taxa de 100% de proteção. Modelos induzidos por PTZ geralmente produzem um espasmo mioclônico, além de convulsões clônicas e espasmos

tônicos dos membros (WHITE e colab., 1995). Geralmente o uso desse composto químico em modelo animal está associado a compostos que agem nos sítios GABAérgicos ou nos canais de cálcio do tipo T (Ca^{2+}), fenobarbital, vigabatrina e tiagabina reduziram convulsões em modelo animal que foram induzidas pelo PTZ (MANDHANE e colab., 2007).

No trabalho de Silva (2013) foram realizados ensaios quanto a ligação da neuropolybina aos receptores gabaérgicos, entretanto não foram encontrados indícios de que o neuropeptídeo se ligou a eles. Dessa maneira, testá-lo *in vitro* em canais de sódio voltagem dependentes se fazia necessário, já que eles são alvos farmacológicos importantes de diversos fármacos largamente utilizados como: fenitoína, carbamazepina, oxcarbazepina, lamotrigina, zonisamida, topiramato e valproato (CHONG e LERMAN, 2016).

No presente estudo, a neuropolybina demonstrou uma discreta ação no canal de sódio voltagem dependente $\text{Nav}1.1$ alterando a cinética de ativação e inativação. A inativação foi afetada alterando seu V_{half} de uma forma que a variação foi de apenas -1,14 com erro de $\pm 0,30$ mV, mas parecida com outras toxinas de vespas que agem em canais de sódio voltagem dependentes, as α -pompilidotoxinas e β -pompilidotoxinas (DEUIS e colab., 2017), sendo a segunda até cinco vezes mais potente que a primeira, apesar da diferença entre elas ser de apenas um resíduo de aminoácido (KONNO e colab., 2000). A β -pompilidotoxina já possui ação conhecida nos canais Nav e age nos segmentos S3 e S4 do DIV pois quando os canais foram mutados nessas regiões, perderam totalmente a afinidade ao peptídeo (KINOSHITA e colab., 2001).

O principal mecanismo de ação de FAEs que atuam em canais de sódio voltagem dependentes é a ligação as conformações inativadas do canal, agindo assim no disparo do potencial de ação, impedindo que seja continuado (ROGAWSKI e LÖSCHER, 2004). Dessa maneira, seria interessante que o peptídeo em questão apresentasse efeito similar a esse,

dificultando a continuação do potencial de ação. Entretanto, se nos canais a neurotoxina age deslocando o shift de voltagem para esquerda, fazendo com que seja necessário um potencial mais negativo para que ele chegue até seu estado inativo ele pode não ser um bom agente terapêutico para esses alvos farmacológicos. Ademais, a concentração de 50 μM pareceu pouco efetiva para os testes, fazendo necessário que sejam feitos testes com uma concentração maior para melhor elucidação do mecanismo, bem como em outros subtipos, uma vez que apenas um subtipo foi testado, por ser aquele que possuía mais mutações relatadas na literatura.

Como demonstrado nos demais estudos com a neuropolybina, em modelos antagonizando receptores muscarínicos através do emprego da Pilocarpina (GOMES, 2016) ou PTZ antagonizando receptores gabaérgicos (COUTO, 2012; SILVA, 2013), ainda existem outros estudos que podem ser feitos *in vitro* afim de elucidar o mecanismo envolvido na atividade antiepiléptica observada nesses estudos, como por exemplo nos canais do tipo T de cálcio. As principais evidências de que os canais de cálcio estejam envolvidos na fisiopatologia da epilepsia são modelos animais que apresentam crises epiléticas não convulsivas, além de animais com mutações em subunidades específicas desses canais e uma superexpressão de correntes com baixo limiar para cálcio (ARMIJO e colab., 2005). Em modelos que utilizam agentes químicos, como o PTZ, para a indução de convulsões conseguem reversão do quadro quando empregam FAEs que agem predominantemente na atividade dos canais de cálcio (LÖSCHER, Wolfgang, 2011), um exemplo de fármaco que age em canais de cálcio do tipo T é a etossuximida, prevenindo crises de ausência. Os canais de cálcio ativados por alta voltagem também são alvos de FAEs como fenitoína, diminuindo a liberação de neurotransmissores (ARMIJO e colab., 2005).

Outro possível local de ação da neuropolybina, e que pode ser mais explorado são os receptores ionotrópicos de glutamato. Esses canais mediam grande parte da transmissão

excitatória rápida que ocorre no SNC, logo estão envolvidos em todas as funções cerebrais, fazendo com que sua ativação excessiva desempenhe um papel importante em crises epiléticas (MELDRUM e ROGAWSKI, 2007). Alguns FAEs como fenobarbital, topiramato e felbamato agem nos receptores AMPA, Cainato e NDMA, respectivamente, mostrando que esses também são possíveis locais para a ação do neuropeptídeo.

5. CONCLUSÕES

A neuropolybina se mostrou um peptídeo neuroativo em canais de sódio voltagem dependente subtipo Na_v 1.1, entretanto a concentração ainda precisa ser adequada para a elucidação dos seus mecanismos no mesmo, bem como se há atividade nos demais subtipos.

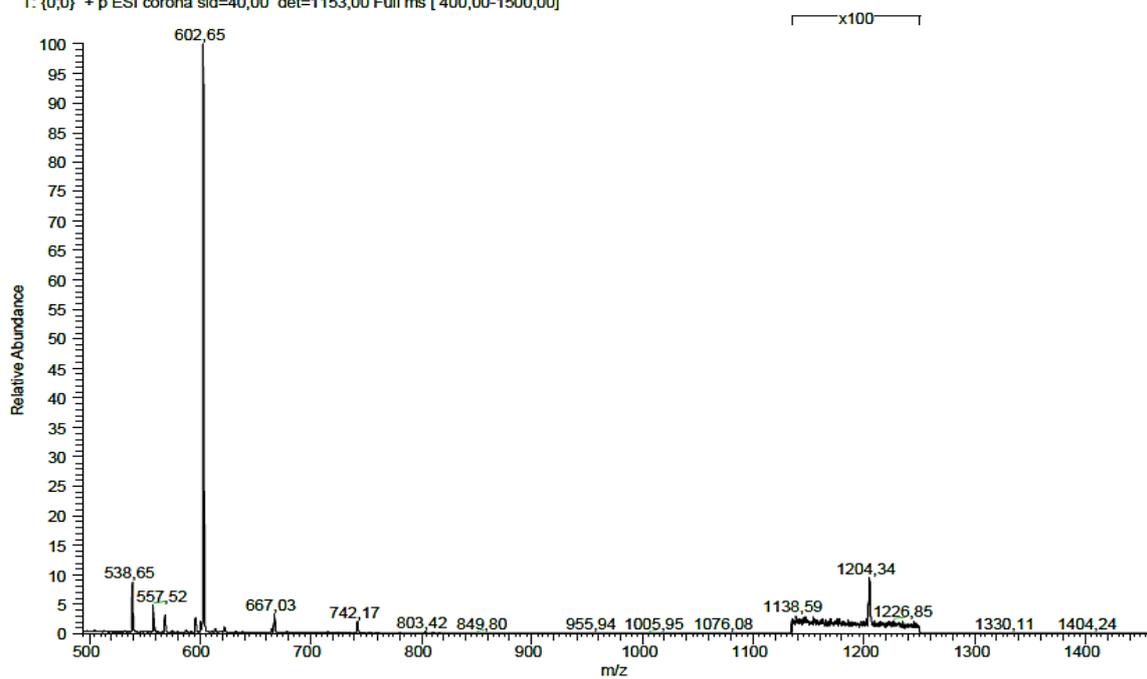
Além disso, foi possível notar que a atividade não foi a esperada para atividade antiepilética, uma vez que o *shift* de voltagem de ativação com pré pulso foi mais negativo, assim como o de inativação.

Nos ensaios de Fração não inibida da corrente não foram observadas diferenças independentemente da realização do pré pulso, e também não foi observada diferença no tempo de recuperação da inativação lenta do canal na presença da toxina.

6. ANEXOS

6.1) Anexo 1

S1221 - FINAL⁻ #178-424 RT: 1,16-3,89 AV: 257 NL: 1,73E5
T: {0;0} + p ESI corona sid=40,00 det=1153,00 Full ms [400,00-1500,00]



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMIJO, J. e colab. **Ion Channels and Epilepsy**. Current Pharmaceutical Design, v. 11, n. 15, p. 1975–2003, 1 Jun 2005. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=11&issue=15&spage=1975>>.

BAXENDALE, Sallie e colab. **Indications and expectations for neuropsychological assessment in epilepsy surgery in children and adults**. Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape, v. 21, n. 3, p. 221–234, 1 Jun 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31262718>>.

BERG, Anne T. e colab. **Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009**. Epilepsia, v. 51, n. 4, p. 676–685, Abr 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1528-1167.2010.02522.x>>.

BRODIE, Martin J. e colab. **The 2017 ILAE classification of seizure types and the epilepsies: what do people with epilepsy and their caregivers need to know?** Epileptic Disorders, v. 20, n. 2, p. 77–87, Abr 2018. Disponível em: <<http://www.john-libbey-eurotext.fr/medline.md?doi=10.1684/epd.2018.0957>>.

CARPENTER, Jenna C. e SCHORGE, Stephanie. **The voltage-gated channelopathies as a paradigm for studying epilepsy-causing genes**. Current Opinion in Physiology, v. 2, p. 71–76, Abr 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.01.004>>.

CATTERALL, William A. **Voltage-dependent gating of sodium channels: correlating structure and function**. Trends in Neurosciences, v. 9, n. C, p. 7–10, Jan 1986. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0166223686900044>>.

CATTERALL, William A. e KALUME, Franck e OAKLEY, John C. **Na V 1.1 channels**

and epilepsy. The Journal of Physiology, v. 588, n. 11, p. 1849–1859, 1 Jun 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2010.187484>>.

CATTERALL, William A. **From Ionic Currents to Molecular Mechanisms.** Neuron, v. 26, n. 1, p. 13–25, Abr 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627300811332>>.

CATTERALL, William A e GOLDIN, Alan L e WAXMAN, Stephen G. **International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels.** Pharmacological reviews, v. 57, n. 4, p. 397–409, Dez 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16382098>>.

CESTÈLE, S. e MANTEGAZZA, M. **Canaux sodiques et canalopathies : douleurs neuropathiques, épilepsies, migraine.** Douleur et Analgésie, v. 29, n. 4, p. 212–220, 12 Dez 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11724-016-0478-8>>.

CHONG, Derek J. e LERMAN, Andrew M. **Practice Update: Review of Anticonvulsant Therapy.** Current Neurology and Neuroscience Reports, v. 16, n. 4, p. 39, 16 Abr 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11910-016-0640-y>>.

CUNHA, Alexandra Olimpio Siqueira e colab. **Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on chemically induced seizures and action on GABA and glutamate receptors.** Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 141, n. 1, p. 50–57, Maio 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1532045605001006>>.

DEUIS, Jennifer R. e colab. **The pharmacology of voltage-gated sodium channel activators.** Neuropharmacology, v. 127, p. 87–108, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.04.014>>.

DEVINSKY, Orrin e colab. **Epilepsy**. Nature Reviews Disease Primers, v. 4, n. 1, p. 18024, 3 Jun 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrdp201824>>.

DO COUTO, Lucianna Lopes e colab. **Anticonvulsant and anxiolytic activity of the peptide fraction isolated from the venom of the social wasp Polybia paulista**. Pharmacognosy magazine, v. 8, n. 32, p. 292–9, Out 2012. Disponível em: <<http://www.phcog.com/text.asp?2012/8/32/292/103657>>.

ESCAYG, Andrew e GOLDIN, Alan L. **Sodium channel SCN1A and epilepsy: Mutations and mechanisms**. Epilepsia, v. 51, n. 9, p. 1650–1658, Set 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1528-1167.2010.02640.x>>.

FIEST, Kirsten M e colab. **Prevalence and incidence of epilepsy**. Neurology, v. 88, n. 3, p. 296–303, 17 Jan 2017. Disponível em: <<http://www.neurology.org/lookup/doi/10.1212/WNL.0000000000003509>>.

FISHER, Robert S. **An overview of the 2017 ILAE operational classification of seizure types**. Epilepsy & Behavior, v. 70, p. 271–273, Maio 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.03.022>>.

FISHER, Robert S. e colab. **ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy**. Epilepsia, v. 55, n. 4, p. 475–482, Abr 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/epi.12550>>.

FISHER, Robert S e colab. **Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology**. Epilepsia, v. 58, n. 4, p. 522–530, Abr 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/epi.13670>>.

HAKAMI, Tahir e colab. **MRI-identified pathology in adults with new-onset seizures**.

Neurology, v. 81, n. 10, p. 920–927, 3 Set 2013. Disponível em: <<http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/WNL.0b013e3182a35193>>.

HIROSE, Shinichi e colab. **SCN1A testing for epilepsy: Application in clinical practice.** Epilepsia, v. 54, n. 5, p. 946–952, 2013.

HULL, Jacob M. e ISOM, Lori L. **Voltage-gated sodium channel β subunits: The power outside the pore in brain development and disease.** Neuropharmacology, v. 132, p. 43–57, Abr 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.018>>.

KALILANI, Linda e colab. **The epidemiology of drug-resistant epilepsy: A systematic review and meta-analysis.** Epilepsia, v. 59, n. 12, p. 2179–2193, 2018.

KARASIN, Beth e KARASIN, Mark. **Epilepsy: Clinical Review and Surgical Options.** AORN Journal, v. 106, n. 5, p. 393–414, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aorn.2017.09.003>>.

KINOSHITA, Eiji e colab. **Novel Wasp Toxin Discriminates between Neuronal and Cardiac Sodium Channels.** Molecular Pharmacology, v. 59, n. 6, p. 1457–1463, 1 Jun 2001. Disponível em: <<http://molpharm.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/mol.59.6.1457>>.

KONNO, Katsuhiro e colab. **Molecular determinants of binding of a wasp toxin (PMTXs) and its analogs in the Na⁺ channels proteins.** Neuroscience Letters, v. 285, n. 1, p. 29–32, Maio 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030439400001017X>>.

KOUTROUMANIDIS, Michalis e colab. **The role of EEG in the diagnosis and classification of the epilepsy syndromes: a tool for clinical practice by the ILAE Neurophysiology Task Force (Part 1).** Epileptic Disorders, v. 19, n. 3, p. 233–298, Set

2017. Disponível em: <<http://www.john-libbey-eurotext.fr/medline.md?doi=10.1684/epd.2017.0935>>.

KWAN, Patrick e colab. **Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies.** *Epilepsia*, v. 51, n. 6, p. 1069–1077, 3 Nov 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1528-1167.2009.02397.x>>.

LEE, Sang Hyun e colab. **Epilepsy in children with a history of febrile seizures.** *Korean Journal of Pediatrics*, v. 59, n. 2, p. 74–79, 2016.

LEUNG, Alexander KC e HON, Kam Lun e LEUNG, Theresa NH. **Febrile seizures: an overview.** *Drugs in Context*, v. 7, n. 3, p. 1–12, 16 Jul 2018. Disponível em: <<https://www.drugsincontext.com/febrile-seizures-an-overview>>.

LÖSCHER, W. e LEPPIK, I.E. **Critical re-evaluation of previous preclinical strategies for the discovery and the development of new antiepileptic drugs.** *Epilepsy Research*, v. 50, n. 1–2, p. 17–20, Jun 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920121102000645>>.

LÖSCHER, Wolfgang. **Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs.** *Seizure*, v. 20, n. 5, p. 359–368, Jun 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.seizure.2011.01.003>>.

MANDHANE, Sanjay N. e AAVULA, Keerthikumar e RAJAMANNAR, T. **Timed pentylenetetrazol infusion test: A comparative analysis with s.c.PTZ and MES models of anticonvulsant screening in mice.** *Seizure*, v. 16, n. 7, p. 636–644, Out 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1059131107001045>>.

- MANFORD, Mark. **Recent advances in epilepsy**. *Journal of Neurology*, v. 264, n. 8, p. 1811–1824, 24 Ago 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00415-017-8394-2>>.
- MANTEGAZZA, Massimo e colab. **Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders**. *The Lancet Neurology*, v. 9, n. 4, p. 413–424, Abr 2010. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70059-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70059-4)>.
- MELDRUM, Brian S e ROGAWSKI, Michael A. **Molecular targets for antiepileptic drug development**. *Neurotherapeutics*, v. 4, n. 1, p. 18–61, Jan 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1016/j.nurt.2006.11.010>>.
- MEYER, Ana-Claire e colab. **Global disparities in the epilepsy treatment gap: a systematic review**. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 88, n. 4, p. 260–266, 1 Abr 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/bulletin/volumes/88/4/09-064147.pdf>>.
- MONGE-FUENTES, Victoria e colab. **Neuroactive compounds obtained from arthropod venoms as new therapeutic platforms for the treatment of neurological disorders**. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 21, n. 1, p. 31, 8 Dez 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s40409-015-0031-x>>.
- MORTARI, Marcia Renata e colab. **Anticonvulsant and Behavioural Effects of the Denatured Venom of the Social Wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae)**. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 97, n. 5, p. 289–295, Nov 2005. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-7843.2005.pto_137.x>.
- OLIVA, Megan e BERKOVIC, Samuel F. e PETROU, Steven. **Sodium channels and the**

neurobiology of epilepsy. *Epilepsia*, v. 53, n. 11, p. 1849–1859, Nov 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1528-1167.2012.03631.x>>.

PAYANDEH, Jian e colab. **Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states.** *Nature*, v. 486, n. 7401, p. 135–139, 20 Jun 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature11077>>.

PAYANDEH, Jian e colab. **The crystal structure of a voltage-gated sodium channel.** *Nature*, v. 475, n. 7356, p. 353–358, 10 Jul 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature10238>>.

QIAO, Xin e colab. **Properties of human brain sodium channel α -subunits expressed in HEK293 cells and their modulation by carbamazepine, phenytoin and lamotrigine.** *British Journal of Pharmacology*, v. 171, n. 4, p. 1054–1067, Fev 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/bph.12534>>.

RAGSDALE, David S. e colab. **Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na⁺ channels.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93, n. 17, p. 9270–9275, 20 Ago 1996. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.93.17.9270>>.

ROGAWSKI, Michael A. e LÖSCHER, Wolfgang. **The neurobiology of antiepileptic drugs.** *Nature Reviews Neuroscience*, v. 5, n. 7, p. 553–564, Jul 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrn1430>>.

SCHEFFER, Ingrid E. e colab. **ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology.** *Epilepsia*, v. 58, n. 4, p. 512–521, Abr 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/epi.13709>>.

SHORVON, Simon D. **The etiologic classification of epilepsy.** *Epilepsia*, v. 52, n. 6, p.

1052–1057, Jun 2011. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21449936>>.

SILVA, Juliana e colab. **Pharmacological Alternatives for the Treatment of Neurodegenerative Disorders: Wasp and Bee Venoms and Their Components as New Neuroactive Tools**. *Toxins*, v. 7, n. 8, p. 3179–3209, 18 Ago 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6651/7/8/3179>>.

VALETA, Thalia. **The Epilepsy Book: A Companion for Patients**. Cham: Springer International Publishing, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-61679-7>>.

WHITE, H. S. e colab. **The early identification of anticonvulsant activity: role of the maximal electroshock and subcutaneous pentylenetetrazol seizure models**. *The Italian Journal of Neurological Sciences*, v. 16, n. 1–2, p. 73–77, Mar 1995. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02229077>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO | Epilepsy: a public health imperative**. [S.l.: s.n.], 2019. Disponível em:
<https://www.who.int/mental_health/neurology/epilepsy/report_2019/en/>.