

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Pa PINHEIRO YOSHIDA, YASMIN GEOVANA  
Avaliação da atividade antinociceptiva de peptídeo opioide  
encriptado, POUCEB 5, em ensaios farmacológicos "in vivo". /  
YASMIN GEOVANA PINHEIRO YOSHIDA; orientador SIMONI CAMPOS  
DIAS; co-orientador PAULO GUSTAVO BARBONI DANTAS. --  
Brasília, 2021.  
39 p.

Monografia (Graduação - FARMÁCIA) -- Universidade de  
Brasília, 2021.

1. Dor. 2. Antinocicepção. 3. Opioides. 4. Peptídeos  
opioides. 5. Testes "in vivo". I. CAMPOS DIAS, SIMONI ,  
orient. II. BARBONI DANTAS, PAULO GUSTAVO, co-orient. III.  
Título.



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA  
CURSO DE FARMÁCIA**

**YASMIN GEOVANA PINHEIRO YOSHIDA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE PEPTÍDEO OPIOIDE ENCRIPADO, POU CB 5 , EM ENSAIOS FARMACOLÓGICOS “*IN VIVO*”.**

**BRASÍLIA, 2021**

**YASMIN GEOVANA PINHEIRO YOSHIDA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE PEPTÍDEO OPIOIDE ENCRIPADO, *POUCB 5*, EM ENSAIOS FARMACOLÓGICOS “*IN VIVO*”.**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

**Orientador: Prof(a). Dra. Simoni Campos Dias**  
**Co- Orientador: Prof. Paulo Gustavo Barboni Dantas**

**BRASÍLIA, 2021**

**YASMIN GEOVANA PINHEIRO YOSHIDA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE PEPTÍDEO OPIOIDE ENCRIPADO, POUCEB 5, EM ENSAIOS FARMACOLÓGICOS “IN VIVO”.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Simoni Campos Dias**

Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia  
Universidade Católica de Brasília

---

**Coorientador : Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas**  
(Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia – UnB/FCE)

---

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Sueli Felipe**

Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia  
Universidade Católica de Brasília.

---

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga**

(Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia – UnB/FCE)

**BRASÍLIA, 2021**

## SUMÁRIO

Resumo .....	5
Abstract .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Lista de abreviaturas .....	7
Lista de quadros e imagens .....	7
1. Introdução .....	8
2. Revisão Bibliográfica .....	9
2.1 Opioides .....	9
2.2. Peptídeos: Moléculas Multifuncionais .....	10
2.3. Peptídeos Opioides .....	12
3.1 Objetivo geral .....	13
3.2 Objetivos específicos .....	13
4. Justificativa .....	13
5. Referências .....	14
6. Artigo .....	21

## RESUMO

Atualmente, os opioides são a classe de fármacos mais utilizados no tratamento de dores intensas a moderada. Embora estes fármacos sejam efetivos no Brasil o acesso a esses medicamentos é limitado. A prospecção de novas terapêuticas para a dor são uma tendência devido a necessidade de otimização do tratamento de pacientes com câncer e outras doenças crônicas. Neste trabalho , inicialmente foi realizado uma busca a partir do genoma presentes em bases de dados e de plantas conhecidas na medicina popular por suas capacidades analgésicas. Após a seleção, cinco sequências foram sintetizadas quimicamente, purificadas e quantificadas. Posteriormente, os peptídeos foram avaliados em camundongos em diferentes concentrações sobre sua capacidade antinociceptiva utilizando o Teste da Placa Quente(Hot Plate). Também foi realizada a análise comportamental dos animais evidenciando a coordenação motora utilizando o teste Labirinto em Cruz Elevado e Teste da Barra Giratória (Rota Rod) destes mesmos animais. A partir das análises dos dados, foi possível observar que o peptídeo nominado como POUCB5 (2x maior) apresentou índice antinocicepção, (índice de latência) em todos os tempos analisados em relação ao grupo controle salina ( $p < 0,01$ ), além de mostrar índice superior ao grupo morfina nos tempos de 30 e 60 minutos de ( $p < 0,001$ ). Além disso, POUCB5 não apresentou diferenças estatísticas significativas nos testes Rota Rod e Labirinto em Cruz elevado quando comparadas ao grupo salina. Sendo assim, as metodologias utilizadas para o peptídeo encriptado sugerem atividade analgésica em camundongos, podendo ser considerado um fármaco em potencial para a terapia analgésica.

Palavras-chave: Dor, antinocicepção, opioides, peptídeos opioides, testes in vivo.

## **ABSTRACT**

Currently, opioids are the class of drugs most used in the treatment of severe to moderate pain. Although these drugs are effective in Brazil, access to these drugs is limited. The prospect of new therapies for pain is a trend due to the need to optimize the treatment of patients with cancer and other chronic diseases. In this work, the bulletin carried out a search based on the genome present in databases and plants in popular medicine for its analgesic resources. After selection, five sequences were chemically synthesized, purified and quantified. Subsequently, the peptides were taken in mice in different options regarding their antinociceptive capacity using the Hot Plate Test. A behavioral analysis of the animals was also carried out, showing motor coordination using the elevated plus-maze test and the Rotating Bar Test (Rota Rod) of these same animals. From the data analysis, it was possible to observe that the peptide named as POUCB5 (2x higher) showed antinociception index, (latency index) at all times of relationship in relation to the saline control group ( $p < 0.01$ ), in addition to show a higher index than the morphine group at 30 and 60 minutes ( $p < 0.001$ ). In addition, POUCB5 does not show significant statistical differences in the Rota Rod and elevated plus-maze when compared to the saline group. Therefore, according to the methodologies used for the encrypted peptide, analgesic activity in mice, which can be considered a potential drug for analgesic therapy.

Keywords: Pain, antinociception, opioids, opioid peptides, in vivo tests.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**UCB:** Universidade Católica de Brasília

**POUCB5 :** Peptídeo opioide da Universidade Católica de Brasília 5

## LISTA DE QUADROS E IMAGENS

**Figura 1:** Fórmula do Índice de antinocicepção.

**Figura 2:** Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) do POUCB 5 em camundongos, utilizando a placa quente por 240 minutos (n= 7 animais por grupo)

**Figura 3:** Índice de latência adquirido nos grupos controle negativo e antagonistas, após a aplicação (i.p.) do POUCB 5 em camundongos, utilizando a placa quente por 240 minutos (n= 7 animais por grupo)

**Figura 4 :** Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) do POUCB 5 em camundongos na concentração de 2x e 4x maior à molaridade da morfina, utilizando a placa quente por 240 minutos(n= 7 animais por grupo).

**Figura 5:** Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) do POUCB 5 em camundongos na concentração de 2x e 4x menor à molaridade da morfina, utilizando a placa quente por 240 minutos(n= 7 animais por grupo)

**Figura 6:** Efeito da administração do POUCB 5 avaliado no Teste Labirinto em cruz elevado durante 5 minutos sobre EBF, EBA. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão (n=7 animais por grupo), (ANOVA seguida do teste de Tukey).

**Figura 7:** Efeito da administração do POUCB 5 avaliado no Teste da cruz elevado durante 5 minutos sobre TBF, TBA, TC. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão (n=7 animais por grupo), onde \* Morfina+ Naloxona < POUCB 5( 4x menor) com  $p < 0,01$ ; # POUCB 5+ Naloxona < POUCB 5 (4x menor) com  $p < 0.01$  e \$ POUCB 5 (4x menor)> salina com  $p < 0.05$  (ANOVA seguida do teste de Tukey).



## 1. INTRODUÇÃO

A dor pode ser compreendida como uma experiência desagradável emocional, sensorial, cognitiva, que se relaciona a um dano real ou potencial em tecido. Esta, se encontra presente no cotidiano das pessoas, afetando as atividades de vida diária como profissão, relacionamentos, estudos (ABEN-ATHAR *et al.*, 2020; RAJA *et al.*, 2020).

A dor crônica é considerada um problema de saúde pública e seu tratamento é realizado de acordo com sua intensidade, utilizando da escala analgésica de três graus, em que quanto mais forte é a dor, mais potente o analgésico. Essa abordagem é centrada no medicamento para controle da dor, vista de maneira segura e benéfica para o tratamento de pacientes (BOUCHAKEL, 2017). Ainda assim, há na América latina a crescente defesa de melhorias na terapia da dor, uma vez que o acesso a medicamentos opioides ainda são considerados como limitados em grande parcela da população (K VOLKOW; BENVENISTE; MCLELLAN, 2018).

Dessa forma, há um interesse na descoberta de novas formas de tratamento que otimizem a qualidade de vida da população, por isso, avanços relacionados ao entendimento sobre mecanismos e tratamento da dor ocorreram nos últimos anos (KRAWCZYK *et al.*, 2018; TONELLO *et al.*, 2020; VOLKOW; BENVENISTE; MCLELLAN, 2018).

Os opioides são uma classe de medicamentos analgésicos amplamente utilizados na dor aguda e oncológica, sendo considerados eficazes no tratamento da dor. Dentre os efeitos colaterais ao seu uso, podemos citar: dependência, overdose e tolerância. Por isso, a busca por analgésicos com eficácia e menor risco de abuso e efeitos adversos são uma tendência. (BARFIELD *et al.*, 2013; RIBEIRO; SCHIMIDT; SCHIMIDT, 2002).

Dentre as alternativas para a produção de medicamentos, os peptídeos, apresentam-se como possibilidade relevante do ponto de vista biotecnológico. Algumas de suas características intrínsecas favorecem o seu interesse farmacológico, visto que, são altamente seletivos e seguros, além da produção de menor complexidade, o que impacta em custo de produção inferior em relação aos produtos biofarmacêuticos tradicionais (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015).

Dessa forma, o desenvolvimento de pesquisas acerca de peptídeos com atividade analgésica opioide são relevantes pois oferecem uma possibilidade alternativa de tratamento da dor de modo que minimize os efeitos adversos comumente presentes. Por isso, o presente estudo possui como finalidade avaliar a ação antinociceptiva de peptídeos provenientes de sequências genômicas de plantas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 OPIOIDES**

Os opioides, são uma classe de analgésicos, frequentemente utilizados no tratamento da dor. Essa classe de fármacos pode ser definida como qualquer composto de origem, sintética, semissintético ou natural que se ligam especificamente aos receptores opioides como antagonista ou agonista (DOWELL; HAEGERICH; CHOU, 2016; FREIRE DUARTE, 2005).

Podem ser classificados pela forma tradicional, quanto sua a potência de ação. Neste caso, podem ser fracos, intermediários ou fortes. Quanto a sua origem divide – se em naturais, que são aqueles provenientes de plantas, ou produzidos pelo corpo humano (opioides endógenos) sem qualquer modificação; semissintéticos quando são resultado de uma modificação parcial de uma substância natural e os sintéticos provenientes de origens não naturais (CEBRID, 2010; TRIVEDI; SHAIKH; GWINNUT, 2017; VOLKOW; BENVENISTE; MCLELLAN, 2018; ZJAWIONY et al., 2019).

Ainda assim, podem ser classificados quanto a função, podendo ser agonistas, quando ao ligarem aos receptores opioides tem aumentada a sua atividade intrínseca a nível celular ou antagonistas que ao se ligarem aos receptores não ocorre atividade (CEBRID, 2010; TRIVEDI; SHAIKH; GWINNUT, 2017; VOLKOW; BENVENISTE; MCLELLAN, 2018; ZJAWIONY et al., 2019).

A morfina, é um agonista clássico dos receptores opioides, sendo o atual padrão ouro dos fármacos opioides, estando presente na lista de medicamentos essenciais da OMS. É amplamente, embora ainda não universalmente, disponível em todo o mundo, é comparativamente barato e é eficaz por via oral (TRIVEDI; SHAIKH; GWINNUT, 2017; WHO, 2013).

Nas últimas duas décadas, houve um aumento dramático na prescrição de medicamentos opioides como estratégia de tratamento para pacientes com dor crônica não oncológica. As evidências apoiam a eficácia de curto prazo dos opioides, enquanto avaliação dos benefícios do uso crônico são considerados incertos pois os danos encontrados associados ao seu uso incluem, dependência, overdose e morte (DOWELL; HAEGERICH; CHOU, 2016b; ZHANG, JING JING et al., 2019).

Portanto, abordagens específicas para analgesia opioide oferecem uma alternativa vantajosa e a descoberta de novos fármacos para o tratamento da dor e que evitem ou minimizem os efeitos adversos dos opioides, devem ser prospectadas (MACHADO-VIEIRA; ZARATE, 2011).

## **2.2. PEPTÍDEOS: MOLÉCULAS MULTIFUNCIONAIS**

Os peptídeos são constituídos de dois ou mais aminoácidos unidos, por ligações covalentes denominadas ligações peptídicas. Em geral, são biomoléculas de sinalização que, ao se ligarem a receptores acoplados a proteínas, ou proteínas características, desencadeiam uma infinidade de cadeia de eventos por diversos tipos de mecanismos (MACHADO et al., 2004; FORBES; KRISHNAMURTHY, 2020).

Ao longo da história, descobriu-se que peptídeos provenientes de diversas fontes, sejam elas vegetais, animais ou advindas de inexplorados ecossistemas possuem diversas propriedades que possibilitam várias aplicações na biotecnologia (BRAND et al., 2012).

Estas aplicações são possíveis pois os peptídeos são funcionalmente diversos podendo apresentar funções: antimicrobiana (UPERT et al., 2020), opioide (DUMITRASCUTA et al., 2020), antioxidante (CAI et al., 2021), antitumoral (HOPPENZ; ELS-HEINDL; BECK-SICKINGER, 2020) e imunomoduladora (APOSTOLOPOULOS et al., 2021). Sendo assim, constituem possibilidades no desenvolvimento de novos fármacos, aumentando as opções terapêuticas existentes (SABIÁ et al., 2019; MORLIGHEM e RÁDIS-BAPTISTA, 2019).

Algumas características intrínsecas dos peptídeos favorecem o seu interesse no desenvolvimento farmacêutico, visto que, são altamente seletivos e seguros, além de sua produção ser considerada de menor complexidade, o que impacta em custo de produção inferior em relação aos produtos biofarmacêuticos tradicionais. (OTVOS, 2008; ANGELL; HOLFORD; MOOS, 2018).

Embora existam maioritariamente aspectos positivos relacionados aos peptídeos, há uma problemática que deve ser observada como ponto de desenvolvimento e melhorias, relacionados a meia vida plasmática curta, instabilidades químicas e físicas, baixa disponibilidade oral, degradação enzimática e rápida depuração (ERAK et al., 2018; FOSGERAU; HOFFMANN, 2015; LAU; DUNN, 2018).

Melhorias relacionadas as alternativas nas vias de administração tradicionais, características físico-químicas, são algumas das necessidades relacionadas a drogas peptídicas e por isso são uma na tendência. Além disso, há expectativas quanto às inovações emergentes dos peptídeos para doenças ainda não atendidas, em especial por possuírem menores índices de efeitos tóxicos e previsibilidade metabólica. Por isso, conjugados e fármacos peptídicos com diversas funcionalidades são uma potencialidade.(ANGELL; HOLFORD; MOOS, 2018; KASPAR; REICHERT, 2013).

Os peptídeos ganharam diversas utilizações na biotecnologia e medicina, como no desenvolvimento da insulina, fármacos anti-hipertensivos, fármacos analgésicos. Sendo o enfoque para prospecção atual, relacionada a terapêutica do câncer e doenças metabólicas (DE LA TORRE; ALBERICIO, 2020; FOSGERAU; HOFFMANN, 2015). Outro fator que favorece o enfoque dado aos peptídeos é a tendência de movimentação econômica em que o mercado global de medicamentos peptídicos tem como perspectiva no ano de 2025 movimentar 50 bilhões de dólares (ZANE et al., 2021).

Diversas cadeias polipeptídicas podem ser encontradas a partir de proteínas no estado bruto, sua prospecção é realizada por meio da aplicação de metodologias. O delineamento pelas metodologias tradicionais foram bem exploradas nas últimas décadas, ocasionando na necessidade de métodos de desenvolvimento inovadores que otimizem os estudos relacionados a descoberta de novos peptídeos. (APOSTOLOPOULOS et al., 2021; PIMENTA; LEBRUN, 2007).

Atualmente metodologias já são utilizadas de forma sistemática, a fim de otimizar quantitativamente e qualitativamente a triagem de peptídeos bioativos, representando uma revolução quanto às técnicas utilizadas e conseqüentemente no desenvolvimento e síntese de novos peptídeos. Estas metodologias incluem de softwares para a seleção de alvos, análises em bancos de dados genômicos e uso da bioinformática (ERAK et al., 2018; PIMENTA; LEBRUN, 2007; RAMADA et al., 2017).

Uma das alternativas para a descoberta de novos fármacos são os peptídeos encriptados. As proteínas quando submetidas a fragmentação, por diversas metodologias distintas apresentam potenciais farmacológicos.(PIMENTA; LEBRUN, 2007). Quando estão em sua proteína de origem, sem modificações, encontram-se inativo, porém, quando liberados exercem funções biológicas divergentes em relação a proteína de origem. Sendo assim, estes se tornam alvos atrativos do ponto de vista biotecnológico (MEISEL; BOCKELMANN, 1999).

A seleção desses peptídeos encriptados pode ser realizada através de técnicas como clivagem proteolítica, hidrólise enzimática e utilização de softwares, como o Kamal, que leva em consideração as características físico-químicas da molécula analisada (BRAND et al., 2019).

### **2.3. PEPTÍDEOS OPIOIDES**

Os peptídeos , podem ser classificados como opioides quando possuem afinidade com os receptores opioides e que conseqüentemente tem seus efeitos antagonizados com a utilização da naloxona, um antagonista padrão relacionado a esses receptores.(BU *et al.*, 2020; MICHAEL J. BROWNSTEIN, 1993). Em relação à origem, os peptídeos opioides podem ser classificados como exógenos ou endógenos (VIANA *et al.*, 2015; ZJAWIONY *et al.*, 2019) .

Os peptídeos exógenos foram descobertos em alimentos e denominados exorfinas na década de 70. Já os peptídeos endógenos foram descritos pela primeira vez também na década de 70, sendo identificada a Met- encefalina e a Leu-encefalina (HUDGHES; SMITH; KOSTERLITZ, 1975).

São descritas três famílias de peptídeos opioides endógenos: encefalinas, dinorfinas e  $\beta$  endorfinas, onde todas apresentam afinidade com as três famílias de receptores opioides. Esses peptídeos, também denominados de peptídeos opioides típicos, derivam das seguintes proteínas precursoras: pró-encefalina, pró-dinorfina e pró-opiomelanocortina (ERDEI *et al.*, 2018; PLEUVRY, 1991).

O interesse no desenvolvimento de diversas pesquisas para a busca e aprimoramento de novos peptídeos com ação analgésica e que apresentem menos efeitos adversos, apresentam uma tendência. Sendo assim, diversas pesquisas têm tido como alvo os peptídeos com potencial analgésico. (ERDEI *et al.*, 2018; ZHANG, W. *et al.*, 2010)

Outros peptídeos isolados de proteínas maiores são as  $\beta$ -caso morfina (BCM's) advindas da beta-caseína presente no leite materno, se ligando ao receptor Mu e conferindo característica opioide. Estas, são transportadas pela membrana mucosa de neonatos, resultando calma e sono em bebês (CHANG *et al.*, 2019; ENJAPOORI *et al.*, 2019).

Utilizando a estratégia de busca de peptídeos encriptados Vineck (2015) descreveu dois peptídeos opioides em plantas de *Coffea arabica* (café), utilizando metodologias proteômicas. Além destes peptídeos, também as rubiscolinas, peptídeos com atividade opioide em folhas de espinafre, foram revelados a partir da digestão enzimática e por síntese química (YANG *et al.*, 2001).

### **(Objetivo geral e objetivos específicos)**

#### **3.1 Objetivo geral:**

Avaliar a ação antinociceptiva e comportamental de um possível peptídeo opioide em experimentos *in vivo*.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- Prospectar, *in silico*, sequências peptídicas de espécies vegetais que possuam N-terminal semelhantes à de opiáceos.
- Avaliar a atividade antinociceptiva dos peptídeos candidatos *in vivo*.
- Avaliar a atividade dos peptídeos candidatos por meio de testes comportamentais.

### **4. Justificativa**

Nos últimos anos, a busca por novos tratamentos para a dor se tornaram relevantes pois as opções existentes apresentam limitações especialmente quanto a sua utilização crônica. A perspectiva de descoberta de novos fármacos analgésicos e por pesquisas que busquem desenvolver tratamentos mais eficazes e seguros são uma tendência.

## 5. REFERÊNCIAS

ABEN-ATHAR, Cintia Yolette Urbano Pauxis *et al.* Limitations in daily activities, risk awareness, social participation, and pain in patients with HTLV-1 using the SALSA and Participation scales. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 24, n. 6, p. 497–504, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.08.009>>.

ANGELL, Yvonne; HOLFORD, Mandë; MOOS, Walter H. Building on Success: A Bright Future for Peptide Therapeutics. *Protein & Peptide Letters*, v. 25, n. 12, p. 1044–1050, 2018.

APOSTOLOPOULOS, Vasso *et al.* A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 26, n. 2, 2021.

BARFIELD, Elizabeth T. *et al.*  $\beta$ -Endorphin Modulates the Effect of Stress on Novelty-Suppressed Feeding. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 7, n. FEB, p. 1–7, 2013.

BOUCHAKEL, Lydia. Patient therapeutic education. *Revue de l'Infirmiere*, v. 2017-Febru, n. 228, p. 53–54, 2017.

BRAND, Guilherme D. *et al.* Probing Protein Sequences as Sources for Encrypted Antimicrobial Peptides. *PLoS ONE*, v. 7, n. 9, 2012.

BRAND, Guilherme D *et al.* Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity. *PloS one*, v. 14, n. 8, 2019.

BU, Guixian *et al.* Opioid Peptides and Their Receptors in Chickens: Structure, Functionality, and Tissue Distribution. *Peptides*, v. 128, n. January, p. 170307, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2020.170307>>.

CAI, Shasha *et al.* Derivatives of gecko cathelicidin-related antioxidant peptide facilitate skin wound healing. *European Journal of Pharmacology*, v. 890, n. August, p. 173649, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173649>>.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 29, n. 8, p. 1193–1205, 2005.

CEBRID. Livreto informativo sobre. *CEBRID Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas*, 2010. Disponível em: <<https://www.cebrid.com.br/wp-content/uploads/2012/12/Livreto-Informativo-sobre-Drogas-Psicotrópicas.pdf>>.

CHANG, W. H. *et al.*  $\beta$ -Casomorphin increases fat deposition in broiler chickens by modulating expression of lipid metabolism genes. *Animal*, v. 13, n. 4, p. 777–783, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S1751731118002197>>.

DE LA TORRE, Beatriz G.; ALBERICIO, Fernando. Peptide therapeutics 2.0. *Molecules*, v. 25, n. 10, p. 2019–2021, 2020.

DE NONI, Ivano *et al.* Scientific Report of EFSA prepared by a DATEX Working Group on the potential health impact of  $\beta$ -casomorphins and related peptides. *EFSA Scientific Report*, v. 231, p. 1–107, 2009.

DEAKIN, J. F. William; GRAEFF, Frederico G. CRITIQUE: 5-HT and mechanisms of defence. *Journal of Psychopharmacology*, v. 5, n. 4, p. 305–315, 1991.

DOWELL, Deborah; HAEGERICH, Tamara M.; CHOU, Roger. CDC guideline for prescribing opioids for chronic pain-United States, 2016. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, v. 315, n. 15, p. 1624–1645, 2016a.

DOWELL, Deborah; HAEGERICH, Tamara M.; CHOU, Roger. CDC Guideline for Prescribing Opioids for Chronic Pain — United States, 2016. *MMWR. Recommendations and Reports*, v. 65, n. 1, p. 1–49, 2016b.



DUMITRASCUTA, Maria *et al.* Mechanistic understanding of peptide analogues, DALDA, [DMT1]DALDA, and KGOP01, binding to the mu opioid receptor. *Molecules*, v. 25, n. 9, p. 1–12, 2020.

ENJAPOORI, Ashwantha K. *et al.* In vivo endogenous proteolysis yielding beta-casein-derived bioactive beta-casomorphin peptides in human breast milk for infant nutrition. *Nutrition*, v. 57, p. 259–267, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.05.011>>.

ERAK, Miloš *et al.* Peptide chemistry toolbox – Transforming natural peptides into peptide therapeutics. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 26, n. 10, p. 2759–2765, 2018.

ERDEI, Anna I. *et al.* Biochemical and pharmacological characterization of three opioid-nociceptin hybrid peptide ligands reveals substantially differing modes of their actions. *Peptides*, v. 99, p. 205–216, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2017.10.005>>.

FOSGERAU, Keld; HOFFMANN, Torsten. Peptide therapeutics: Current status and future directions. *Drug Discovery Today*, v. 20, n. 1, p. 122–128, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>>.

FREIRE DUARTE, Danilo. Opium and opioids: A brief history. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 55, n. 1, p. 135–146, 2005.

GIROS, Bruno *et al.* The endogenous tripeptide Tyr-Gly-Gly as a possible metabolite of opioid peptides in rat brain: Identification, regional distribution, effects of lesions and formation in depolarized slices. *Peptides*, v. 7, n. 4, p. 669–677, 1986.

HOOK, Vivian *et al.* Neuropeptidomic components generated by proteomic functions in secretory vesicles for cell-cell communication. *AAPS Journal*, v. 12, n. 4, p. 635–645, 2010.

HOPPENZ, Paul; ELS-HEINDL, Sylvia; BECK-SICKINGER, Annette G. Peptide-Drug Conjugates and Their Targets in Advanced Cancer Therapies. *Frontiers in Chemistry*, v. 8, n. July, p. 1–24, 2020.

HUDGHES, J; SMITH, T W; KOSTERLITZ, H W. © 1975 Nature Publishing Group. 1975.

IMBELONI, L E. Naloxona: Estado Atual Artigo de Revisão. *Rev Bras Anest*, v. 39, n. 2, p. 133–141, 1989.

KASPAR, Allan A.; REICHERT, Janice M. Future directions for peptide therapeutics development. *Drug Discovery Today*, v. 18, n. 17–18, p. 807–817, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2013.05.011>>.

LAU, Jolene L.; DUNN, Michael K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 26, n. 10, p. 2700–2707, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>>.

MACHADO-VIEIRA, Rodrigo; ZARATE, Carlos A. Proof of concept trials in bipolar disorder and major depressive disorder: A translational perspective in the search for improved treatments. *Depression and Anxiety*, v. 28, n. 4, p. 267–281, 2011.

MACHADO, Alessandra *et al.* Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 781–789, 2004.

MANN, Bimlesh *et al.* *Bioactive peptides from whey proteins*. [S.l.]: Elsevier Inc., 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00015-1>>.

MEISEL, Hans; BOCKELMANN, Wilhelm. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 76, n. 1–4, p. 207–215, 1999.

MICHAEL J. BROWNSTEIN. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 90, n. 12, p. 5391–5393, 1993. Disponível em: <<https://www.mendeley.com/viewer/?fileId=2748b363-305f-43116a3c171b74a43332&documentId=6b4dc5ca-8403-3307-9265-ceb50db3e6ec>>.

OLIVEIRA, Debora Alencar. *O Labirinto em Cruz Elevado como Modelo de Adicção Animal : Efeito Comportamental do Pareamento de Morfina com os Braços Abertos O Labirinto em Cruz Elevado como Modelo de Adicção Animal : Efeito Comportamental do Pareamento de Morfina com os Braços Abert.* 2012. 54 f. 2012. Disponível em: <[https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/10719/1/2012\\_DeborahAlencardeOliveira.pdf](https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/10719/1/2012_DeborahAlencardeOliveira.pdf)>.

PELLOW, Sharon *et al.* Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.

PIMENTA, Daniel C.; LEBRUN, Ivo. Cryptides: Buried secrets in proteins. *Peptides*, v. 28, n. 12, p. 2403–2410, 2007.

PLEUVRY, B. J. Opioid receptors and their ligands: Natural and unnatural. *British Journal of Anaesthesia*, v. 66, n. 3, p. 370–380, 1991. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/bja/66.3.370>>.

RAJA, Srinivasa N. *et al.* The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, v. 161, n. 9, p. 1976–1982, 2020.

RAMADA, M H S *et al.* Encrypted antimicrobial peptides from plant proteins. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.

RIBEIRO, Sady; SCHIMIDT, André prato; SCHIMIDT, Sergio Renato Guimarães. O Uso de Opióides no Tratamento da Dor Crônica. v. 52, p. 644–651, 2002.

SOARES, Renata Patrícia de Freitas. *IDENTIFICAÇÃO DOS EFEITOS ANALGÉSICOS E EMBRIOFETOTÓXICOS DO EXTRATO DAS FOLHAS DE Cissus*. 2006. 1–95 f. 2006. Disponível em: <[https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/8628/1/arquivo8550\\_1.pdf](https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/8628/1/arquivo8550_1.pdf)>.

TONELLO, Raquel *et al.* Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , a dual blocker of TRPA1 and Cav2.2, as an adjuvant drug in opioid therapy for postoperative pain. *Toxicon*, v. 188, n. July, p. 80–88, 2020.

TRIVEDI, Mahesh; SHAIKH, Shafee; GWINNUT, Carl. Pharmacology of opioids. *Basic Sciences in Anesthesia*, p. 123–137, 2017.

TSENG, Leon F. The antinociceptive properties of endomorphin-1 and endomorphin-2 in the mouse. *Japanese Journal of Pharmacology*, v. 89, n. 3, p. 216–220, 2002.

UPERT, Gregory *et al.* Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . n. January, 2020.

VIANA, Juliane F.C. *et al.* Antifungal nanofibers made by controlled release of sea animal derived peptide. *Nanoscale*, v. 7, n. 14, p. 6238–6246, 2015.

VINECKY, Felipe. *IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS OPIOIDES PRESENTES NA FRAÇÃO PROTEICA DE GRÃOS DE Coffea arabica*. 2015. 79 f. 2015.

VOLKOW, Nora; BENVENISTE, Helene; MCLELLAN, A. Thomas. Use and Misuse of Opioids in Chronic Pain. *Annual Review of Medicine*, v. 69, p. 451–465, 2018.

WANG, Zi Long *et al.* Opposite effects of neuropeptide FF on central antinociception induced by endomorphin-1 and endomorphin-2 in mice. *PLoS ONE*, v. 9, n. 8, p. 1–12, 2014.

WHO. Model List of Essential Medicines. *World Health Organization*, n. April, p. 45, 2013. Disponível em: <[http://www.who.int/medicines/organization/par/edl/expcom13/eml13\\_en.pdf](http://www.who.int/medicines/organization/par/edl/expcom13/eml13_en.pdf)>.

YANG, Shuzhang *et al.* Rubiscolin, a  $\delta$  selective opioid peptide derived from plant Rubisco. *FEBS Letters*, v. 509, n. 2, p. 213–217, 2001.

ZANE, Doris *et al.* Development and Regulatory Challenges for Peptide Therapeutics. *International Journal of Toxicology*, v. 40, n. 2, p. 108–124, 2021.

ZHANG, Jing Jing *et al.* Effect of different types of laryngeal mask airway placement on the right internal jugular vein: A prospective randomized controlled trial. *World Journal of Clinical Cases*, v. 7, n. 24, p. 4245–4253, 2019.

ZHANG, W. *et al.* OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis. Part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 18, n. 4, p. 476–499, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2010.01.013>>.

ZJAWIONY, Jordan K. *et al.* Cutting-edge search for safer opioid pain relief: Retrospective review of salvinorin A and its analogs. *Frontiers in Psychiatry*, v. 10, n. MAR, p. 1–11, 2019.

## **AValiação DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE PEPTÍDEO OPIOIDE ENCRIPtADO, POUcB 5, EM ENSAIOS FARMACOLÓGICOS “IN VIVO”.**

Autores: Yasmin Geovana Pinheiro Yoshida ; Marcia Silva Nogueira; Leticia Ferreira Lima; Marcelo Henrique Soler Ramada; Simoni Campos Dias

### **RESUMO**

Atualmente, os opioides são a classe de fármacos mais utilizados no tratamento de dores intensas a moderada. Embora estes fármacos sejam efetivos no Brasil o acesso a esses medicamentos é limitado. A prospecção de novas terapêuticas para a dor são uma tendência devido a necessidade de otimização do tratamento de pacientes com câncer e outras doenças crônicas. Neste trabalho , inicialmente foi realizado uma busca a partir do genoma presentes em bases de dados e de plantas conhecidas na medicina popular por suas capacidades analgésicas. Após a seleção, cinco sequências foram sintetizadas quimicamente, purificadas e quantificadas. Posteriormente, os peptídeos foram avaliados em camundongos em diferentes concentrações sobre sua capacidade antinociceptiva utilizando o Teste da Placa Quente(Hot Plate). Também foi realizada a análise comportamental dos animais evidenciando a coordenação motora utilizando o teste Labirinto em Cruz Elevado e Teste da Barra Giratória (Rota Rod) destes mesmos animais. A partir das análises dos dados, foi possível observar que o peptídeo nominado como POUcB5 (2x maior) apresentou índice antinocicepção, (índice de latência) em todos os tempos analisados em relação ao grupo controle salina ( $p < 0,01$ ), além de mostrar índice superior ao grupo morfina nos tempos de 30 e 60 minutos de ( $p < 0,001$ ). Além disso, POUcB5 não apresentou diferenças estatísticas significativas nos testes Rota Rod e Labirinto em Cruz elevado quando comparadas ao grupo salina. Sendo assim, as metodologias utilizadas para o peptídeo encriptado sugerem atividade analgésica em camundongos, podendo ser considerado um fármaco em potencial para a terapia analgésica.

Palavras-chave: Dor, antinocicepção, opioides, peptídeos opioides, testes in vivo.

## **ABSTRACT**

Currently, opioids are the class of drugs most used in the treatment of severe to moderate pain. Although these drugs are effective in Brazil, access to these drugs is limited. The prospect of new therapies for pain is a trend due to the need to optimize the treatment of patients with cancer and other chronic diseases. In this work, the bulletin carried out a search based on the genome present in databases and plants in popular medicine for its analgesic resources. After selection, five sequences were chemically synthesized, purified and quantified. Subsequently, the peptides were taken in mice in different options regarding their antinociceptive capacity using the Hot Plate Test. A behavioral analysis of the animals was also carried out, showing motor coordination using the elevated plus-maze test and the Rotating Bar Test (Rota Rod) of these same animals. From the data analysis, it was possible to observe that the peptide named as POUCB5 (2x higher) showed antinociception index, (latency index) at all times of relationship in relation to the saline control group ( $p < 0.01$ ), in addition to show a higher index than the morphine group at 30 and 60 minutes ( $p < 0.001$ ). In addition, POUCB5 does not show significant statistical differences in the Rota Rod and elevated plus-maze when compared to the saline group. Therefore, according to the methodologies used for the encrypted peptide, analgesic activity in mice, which can be considered a potential drug for analgesic therapy.

Keywords: Pain, antinociception, opioids, opioid peptides, in vivo tests.

## 1. INTRODUÇÃO

A dor pode ser compreendida como uma experiência desagradável emocional, sensorial, cognitiva, que se relaciona a um dano real ou potencial em tecido. Esta, se encontra presente no cotidiano das pessoas, afetando as atividades de vida diária como profissão, relacionamentos, estudos (ABEN-ATHAR *et al.*, 2020; RAJA *et al.*, 2020).

Sendo considerada um problema de saúde pública, a dor possui seu tratamento de acordo com sua intensidade, utilizando da escala analgésica de três graus, em que quanto mais forte é a dor, mais potente o analgésico. Essa abordagem é centrada no medicamento para controle da dor, vista de maneira segura e benéfica para o tratamento de pacientes (BOUCHAKEL, 2017).

Dessa forma, há um interesse na descoberta de novas formas de tratamento que otimizem a qualidade de vida da população e por isso avanços relacionados ao entendimento sobre mecanismos e tratamento da dor ocorreram nos últimos anos. Contudo, ainda existem perspectivas que proporcionem um melhor tratamento aos pacientes, visto que o acesso a medicamentos de dor moderada a intensa são estimados como limitados em cerca de 80% da população (TONELLO *et al.*, 2020; VOLKOW; BENVENISTE; MCLELLAN, 2018).

Os opioides são uma classe de medicamentos analgésicos amplamente utilizados na dor aguda e oncológica, sendo considerados eficazes no tratamento da dor. Dentre as consequências do uso de opioides estão os efeitos colaterais ao seu uso, sendo eles: dependência, overdose e tolerância. Por isso, a busca por analgésicos com eficácia e menor risco de abuso e efeitos adversos são uma tendência (BARFIELD *et al.*, 2013; RIBEIRO; SCHIMIDT; SCHIMIDT, 2002).

Dentre as alternativas para a produção de medicamentos, os peptídeos, apresentam-se como possibilidade relevante do ponto de vista biotecnológico. Algumas de suas características intrínsecas favorecem o seu interesse farmacológico, visto que, são altamente seletivos e seguros, além da produção de menor complexidade, o que impacta em custo de produção inferior em relação aos produtos biofarmacêuticos tradicionais (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015).

Dessa forma, o desenvolvimento de pesquisas acerca de peptídeos com atividade analgésica opioide são relevantes pois oferecem uma possibilidade alternativa de tratamento da dor de modo que minimize os efeitos adversos



comumente presentes. Por isso, o presente estudo possui como finalidade avaliar a ação antinociceptiva de peptídeos provenientes de sequências genômicas de plantas.

## **2.METODOLOGIA**

### **2.1. Busca por sequências de peptídeos opioides em espécies vegetais e síntese química**

Inicialmente foi realizada a busca de plantas conhecidas por seu efeito analgésico medicinal, de acordo com bancos de dados científicos e de conhecimento da medicina popular, sendo selecionadas 100 espécies de plantas. Posteriormente, foi realizada a busca da sequência genômica das espécies selecionadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

No NCBI, na seção protein , utilizando a da pasta fasta e com o auxílio do programa Notpad++, foi realizada análise na região amino-terminal, das sequências genômicas por meio da busca pelas seguintes cadeias peptídicas :YGG(GIROS *et al.*, 1986), YPF, YPW(DE NONI *et al.*, 2009), YGGF(MANN *et al.*, 2018) ,YGGW(DE NONI *et al.*, 2009). Estas sequências peptídicas estão relacionadas à peptídeos opioides naturais encriptados para as classes: encefalinas e dinorfinas; casomorfinas, morficeptinas, hemorfinas e endomorfinas ou deltorfinas. O tamanho da cadeia peptídica que foi buscada variou entre 7 a 11 resíduos de aminoácidos, observando também se a ocorrência dos sítios de clivagem K, K ou K, R . (HOOK *et al.*, 2010).

As sequências peptídicas selecionadas foram sintetizadas em fase sólida pela Empresa Aminotech - Industria e Comercio Ltda (Campinas-São Paulo) através de um protocolo de síntese química, de acordo com a metodologia em fase sólida F-moc (Uso de 9- fluorenilmetil carbonila como protetor do grupo amino), purificados (> 95%), liofilizados e armazenados. A verificação das massas moleculares e o grau de pureza dos peptídeos sintetizados foi realizada utilizando a análise de MALDI-TOF MS / MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry) em UltraFlex III,BrukerDaltonics®, Billerica, MA.

## 2.2 Ensaios in vivo:

### 2.2.1 Animais

A manipulação dos animais experimentais ocorreu de acordo com os Princípios COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Previamente esta pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA/IB) da Universidade Católica de Brasília, apresentando o número de protocolo nº 006/2019, cujo certificado encontra-se anexado ao final.

Foram utilizados camundongos, machos (20 a 25g) *Mus musculus* da linhagem balb/c, com aproximadamente 6-8 semanas de vida. Os animais foram acondicionados no biotério central da Universidade Católica de Brasília e submetidos ao ciclo claro/escuro 12/12 horas, temperatura ( $25^{\circ}\text{C}\pm 2$ ) e umidade (55%) controladas, respeitando o número máximo de sete animais por gaiola. Durante todo o período experimental, foram ofertadas água e alimentação *ad libitum*.

Para os testes, foram utilizados grupos de animais (n=7), representados na Tabela 1. A administração das drogas foi realizada via intraperitoneal (i.p).

Tabela 1 : Tabela de grupos de animais e tratamentos administrados (i.p) e suas respectivas concentrações.

GRUPOS	TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO
Controle +	Sulfato de morfina	(10 mg.kg <sup>-1</sup> de animal; 26,08 $\mu\text{M}$ )
Controle –	Salina	(0,9%, p/v)
Controle Antagonista	Morfina + Cloridrato de <b>Naloxona</b>	(10 mg.kg <sup>-1</sup> de animal; 26,08 $\mu\text{M}$ ); <b>0,4 mg.kg – 1 (2,75 <math>\mu\text{M}</math>)</b>
Grupo I	POUCB 5	(10 mg.kg <sup>-1</sup> de animal; 26,08 $\mu\text{M}$ )
Grupo II	POUCB 5+ Cloridrato de <b>Naloxona</b>	(10 mg.kg <sup>-1</sup> de animal; 26,08 $\mu\text{M}$ ); <b>0,4 mg.kg – 1 (2,75 <math>\mu\text{M}</math>)</b>
Grupo III	POUCB5 2x maior	2X maior à concentração molar molaridade (26,08 $\mu\text{M}$ )
Grupo IV	POUCB5 4x maior	4X maior à molaridade (26,08 $\mu\text{M}$ )
Grupo V	POUCB5 2x menor	2X menor à molaridade (26,08 $\mu\text{M}$ )
Grupo VI	POUCB5 4x menor	4X menor à molaridade (26,08 $\mu\text{M}$ )

### 2.2.2 -Teste de antinocicepção

Para a avaliação da antinocicepção, foi utilizado o modelo de teste Placa quente (hot plate). Os camundongos foram introduzidos, um por vez, depois de 30, 60, 90, 120, 150, 180,210 e 240 minutos da aplicação dos tratamentos, em uma placa quente de temperatura de  $55 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

Foram registrados os tempos de latência de cada animal. O tempo de latência, pode ser compreendido como o tempo que o camundongo levou para manifestar sinais antinociceptivos como: lambidas em uma das patas traseiras, latência de fuga do aparelho (pulo). A partir desses dados, pode-se calcular o índice de antinocicepção, conforme indicado na Figura 1.

$$[\text{IA} = (\text{LAT} - \text{LMB}) / (\text{LMAX} - \text{LMB})]$$

Figura 1: Fórmula do Índice de antinocicepção. Em que, (IA) é o índice de antinocicepção, (LAT) é a latência do teste, sendo representado pelo tempo em segundos que o animal levou para manifestar sinais antinociceptivos, (LMB) é a latência média basal, sendo representado pela média de três tempos da latência antes da aplicação do tratamento e (LMAX) a latência máxima, sendo representada pelo tempo de 30 segundos.

Na etapa de análise da latência média basal, os animais foram previamente selecionados, apenas os animais que responderam no tempo de  $\leq 15\text{s}$  foram selecionados. Já na latência do teste, os animais que não apresentavam reação dentro de um período de 30 segundos eram retirados do equipamento com o objetivo de minimizar a lesão tecidual (WOOLFE & MACDONALD,1944).

### 2.2.3 Labirinto em cruz elevada

Para análise da ansiedade, os animais foram introduzidos na plataforma central e avaliados nos tempos 30,60,90,120,150,180,210, 250 minutos após a aplicação do tratamento. Foram registradas o número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos e fechados de cada camundongo, sendo contabilizados manualmente o tempo em cada braço. O número de entradas nos braços fechados foi considerado índice de atividade locomotora e a % de tempo nos braços abertos,

como índice de ansiedade. A análise dos vídeos foi realizada por um único observador, diferente do experimentador (LISTER, 1987).

#### **2.2.4 Teste da barra giratória (Rota Rod)**

Para avaliar os efeitos de fármacos na coordenação motora, foi utilizado o teste Rota Rod. A ambientação e habituação, foi realizada com os grupos 24 horas antes das administrações, dividido em três séries de dois minutos, com intervalos de 30 minutos entre cada treino. Após 24 horas, foram colocados sobre a barra giratória sob rotação, durante dois minutos por 3 vezes, nos tempos de 30, 120 e 240 minutos após a administração do tratamento (DUNHAM; MIYA, 1957).

#### **5.3. Análise de dados**

A análise estatística dos testes foi realizada com o programa GraphPad Prism (GraphPad software, Estados Unidos) para auxiliar na interpretação das mensurações do índice de antinocicepção (IA) e Ansiedade, foram expressos como (média  $\pm$  e.p.m) e analisados através dos testes “t” de Student e ANOVA (seguida do teste de Dunnett). Utilizado Two way ANOVA seguida de Bonferroni para gráficos referentes a Placa Quente, e utilizado ANOVA seguida do teste de Tukey para gráficos referentes à Labirinto em Cruz Elevado. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Uma vez realizada a escolha das sequências peptídicas de acordo com as características de suas sequencias de aminoácidos, os peptídeos POUCB3, POUCB4 e POUCB5 foram selecionados. Outros peptídeos opioides encriptados, como PSLEM 11043 e Rubiscolinas, foram descritos em estudos anteriores, evidenciando que a busca de fármacos analgésicos por peptídeos encriptados são uma alternativa (VINECKY, 2015; YANG *et al.*, 2001). Neste trabalho, vamos descrever o resultado da avaliação do peptídeo POUCB 5.

A figura 2, nos revela a latência obtida quando os animais eram submetidos ao teste da placa quente aos 30 minutos após a administração por via intraperitoneal. Para a avaliação de atividade analgésica relacionada aos mecanismos opioides, foi

utilizada a naloxona, pois a mesma possui grupos farmacofóricos semelhantes a morfina, porém, com ação antagonista. Sendo assim, pode-se compreender que caso a naloxona seja administrada após a administração de um fármaco opioide, a antinocicepção será diminuída.

A partir dos dados analisados, POUCB 5 demonstrou o efeito antinociceptivo no teste de placa quente possuindo diferença estatística ( $p < 0.001$ ) em relação ao controle negativo (salina). Além disto, por possuir efeito antinociceptivo equivalente, quando comparado com a morfina nos tempos de 90 minutos em diante, como demonstrado na figura 2 pode ser considerado fármaco analgésico em potencial (VINECKY, 2015; YANG *et al.*, 2001).

A latência reflete o que? Latência de retirar a pata da placa quente?

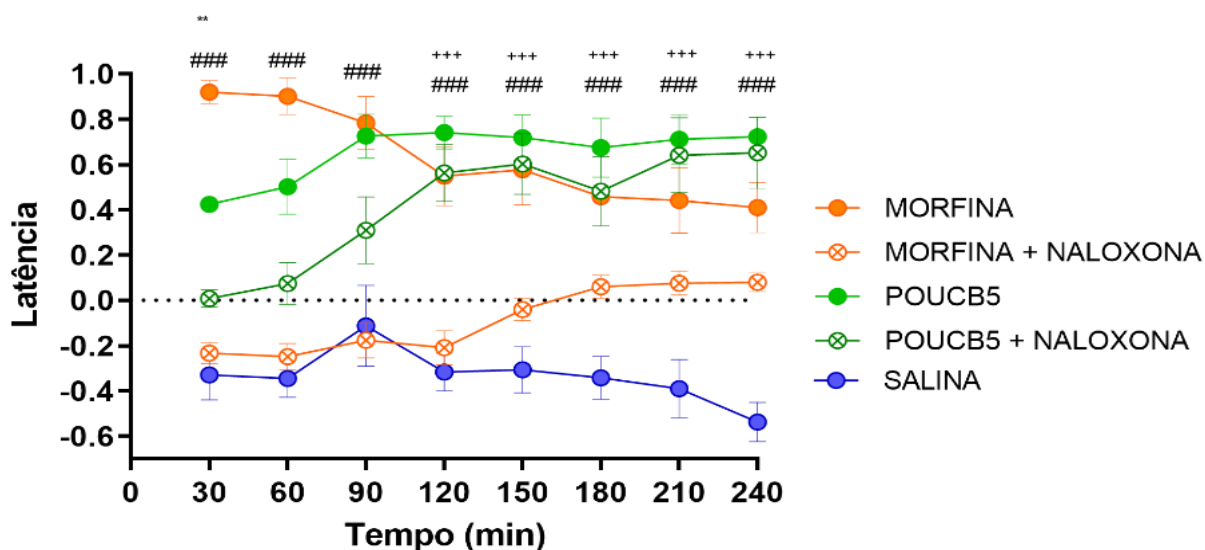


Figura 2: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) do POUCB 5 em camundongos, utilizando a placa quente por 240 minutos ( $n = 7$  animais por grupo). ### Água < POUCB 5 com  $p < 0,001$ ; +++ POUCB 5+ naloxona > Água com  $p < 0,001$ ; \*\* Morfina > POUCB 5 com  $p < 0,01$ ; Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 7$  animais por grupo) - Two-way ANOVA seguida de Bonferroni pós-teste.

Quando POUCB 5 foi associado com naloxona podemos observar diminuição na ação antinociceptiva (Figura 2), sugerindo ação opioide agonista do peptídeo, embora esta seja uma justificativa parcial, pois embora ocorra a redução da latência, quando comparado ao controle antagonista pode-se observar diferenças quanto aos

padrões apresentados. A partir do instante 90 minutos, o índice de latência aumenta gradualmente com o decorrer do tempo do experimento. Este resultado pode ser justificado já que o tempo de meia vida da naloxona varia entre 45 a 90 minutos. (IMBELONI, 1989).

A meia vida de eliminação pode ser compreendida como o tempo necessário para que um fármaco leve para que sua concentração plasmática seja reduzida à metade. Sendo assim, pela administração do cloridrato de naloxona ser em dose única após 15 minutos da aplicação do POUCB5, após o tempo de meia vida, os receptores do sistema nervoso são liberados para a ligação do peptídeo (IMBELONI, 1989; RANG *et al.*, 1992).

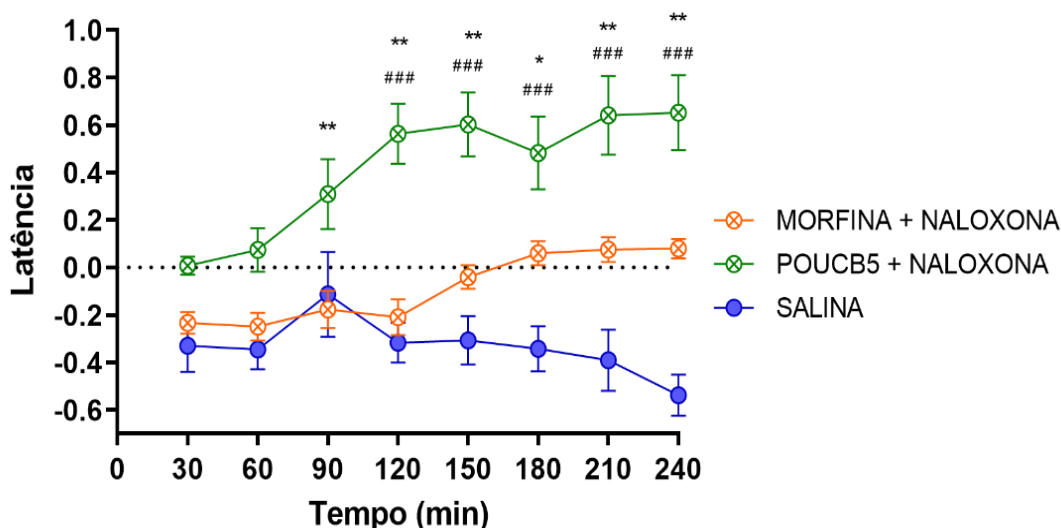


Figura 3: Índice de latência nos grupos controle negativo e antagonistas, após a aplicação (i.p.) do POUCB 5 em camundongos, utilizando a placa quente por 240 minutos (n= 7 animais por grupo). ### Água < POUCB 5+ naloxona com  $p < 0,001$ ; \*\* POUCB5 + naloxona < Morfina+ Naloxona com  $p < 0,01$ ; \* POUCB5 + naloxona < Morfina+ Naloxona com  $p < 0,05$ . Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão (n=7 animais por grupo) - Two-way ANOVA seguida de Bonferroni pós-teste

A latência do POUCB 5 foi diminuída quando associada a naloxona, mostrando diferença estatística significativa quando comparada à morfina + naloxona, nos instantes 90, 120, 150, 210 e 240 minutos com  $p < 0,01$ . Em relação ao grupo salina, o grupo peptídeo + naloxona, apresentou diferença estatística com  $p < 0,001$  dos 120 minutos em diante.

Pode-se sugerir que o POUCEB 5 interage com os receptores opioides. Entretanto, conforme já descrito em estudos anteriores, Tseng e Wang evidenciaram que endomorfina provocaram efeitos analgésicos por meios divergentes aos agonistas de receptores opioides, como por intermédio na liberação de serotonina e adrenalina. Portanto, a possibilidade de interações com outros receptores, não pode ser descartada (TSENG, 2002; WANG *et al.*, 2014).

Quando POUCEB 5 foi avaliado em dosagens duas ou quatro vezes superior a dose equimolar a morfina, não houve diferença estatística entre as dosagens e o índice de latência no decorrer de 240 minutos. Entretanto quando comparado com a salina, o peptídeo apresentou diferença estatística de  $p < 0,001$  nos instantes 60,120, 150,180,210,240 minutos. O mesmo resultado pode ser observado em relação a morfina, nos instantes 30 e 60 minutos ( $p < 0,001$ ). Nos demais tempos não foi observada diferença estatística significativa embora tenha latência superior a morfina a partir do instante 180 minutos (Figura 3).

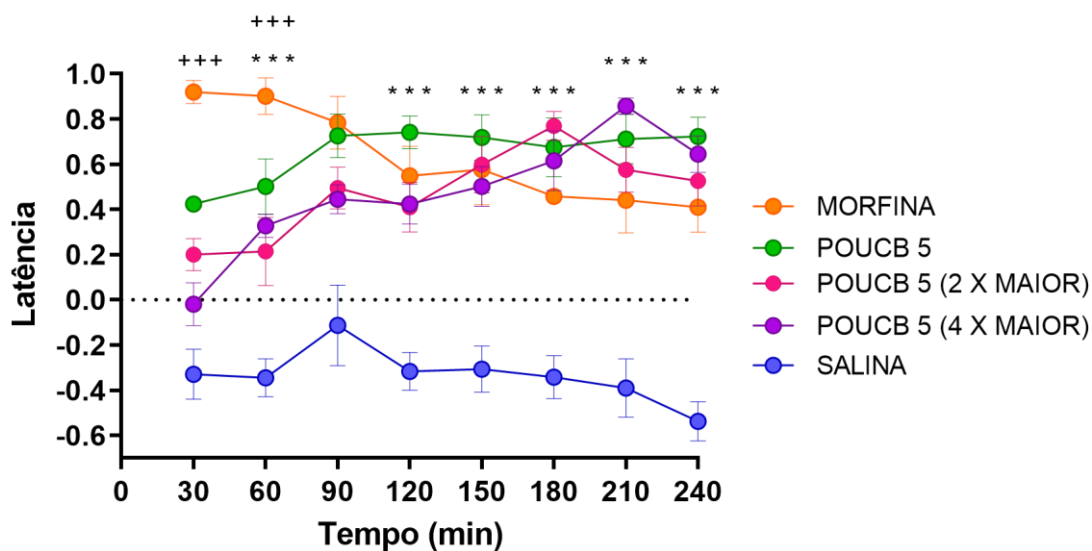


Figura 4: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) do POUCEB 5 em camundongos na concentração de 2x e 4x maior à molaridade da morfina, utilizando a placa quente por 240 minutos (n= 7 animais por grupo). +++ Morfina > POUCEB 5 (4X Maior) com  $p < 0,001$ ; \*\*\* POUCEB 5 > Salina com  $p < 0,001$ . Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão (n=7 animais por grupo) - Two-way ANOVA seguida de Bonferroni pós-teste.

A figura 5 nos indica o índice de latência produzido POUCB 5 em 2 e 4 vezes menor em relação a dose equimolar a morfina. Pode-se observar que não há diferença estatística significativa entre as dosagens duas e quatro vezes menores do peptídeo candidato.

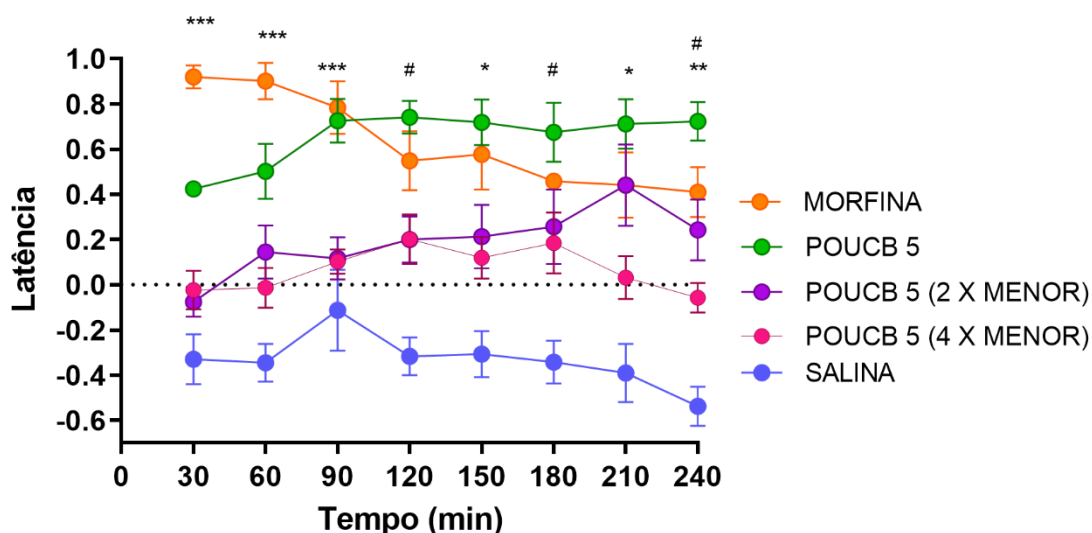


Figura 5: Índice de latência adquirido em diferentes tempos após a aplicação (i.p.) do POUCB 5 em camundongos na concentração de 2x e 4x menor à molaridade da morfina, utilizando a placa quente por 240 minutos (n= 7 animais por grupo). \*\*\* Morfina > POUCB 5 (4X menor) com  $p < 0,001$ ; # POUCB 5 (4x menor) > Salina com  $p < 0,05$ ; . Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão (n=7 animais por grupo) - Two-way ANOVA seguida de Bonferroni pós-teste.

Quando utilizado em uma dosagem 4x menor em relação a morfina o peptídeo mostrou nos instantes 30, 60 e 90 minutos efeito superior a morfina ( $p < 0,001$ ) enquanto que nos demais instantes apresentou diferença estatística significativa com  $p < 0,05$ . Entretanto podemos observar que mesmo utilizando uma dosagem 4 vezes menor do peptídeo, o mesmo mostrou atividade antinociceptiva, nos tempos 120, 180 e 240 minutos quando o mesmo é comparado a salina ( $p < 0,05$ ) (**figura 5**). O mesmo podemos relatar quando comparamos as dosagens 2 e 4 vezes menores em relação a dosagem da morfina, pois o peptídeo mesmo em dosagens inferiores a dose equimolar da morfina. Os dados demonstram diferenças significativas com  $p < 0,001$  em relação a morfina nos instantes 30, 60 e 90 minutos.

Em trabalhos anteriores descritos por Vinecky (2011) e Galante e colaboradores (2019) também avaliaram a atividade antinociceptiva de seus peptídeos candidatos com a doses equimolares a morfina. POUCB5 apresentou



diferença estatística significativa de  $P < 0,001$  em relação ao grupo salina, possuindo resultados superiores a estes estudos anteriores, que por sua vez demonstraram  $p < 0,05$  em comparação ao mesmo grupo controle.

Além disso, POUCB 5 apresenta melhores resultados que os peptídeos PSLEM 11043 (VINECKY, 2011) e Protonectina-F (GALANTE, 2019) quando comparados ao grupo morfina. Pois, enquanto a protonectina - F não demonstrou índices de latência superior a morfina e PSLEM 11043 demonstrou ter latência superior a morfina somente a partir dos 180 minutos, POUCB 5 apresenta índice de latência superior a partir dos 90 minutos, sendo um diferencial em relação aos estudos descritos anteriormente, pois não houve a exposição das análises entre o controle positivo e o peptídeo candidato.

Opioides quando administrados, além da analgesia ocasionam sedação, enquanto que sua suspensão o uso dos opioides pode-se ocasionar ansiedade. Dessa forma, estudos que busquem compreender a relação de novos fármacos opioides e sua correlação com a ansiedade são necessários (BENSEÑOR; CICARELLI, 2003; OLIVEIRA, 2012; *et al.*, 2014).

Atualmente, o teste de labirinto em cruz elevada representa um teste clássico para esta finalidade, sendo uma das principais ferramentas na avaliação da ansiedade. Sendo considerado, de medição convencional, rápido e econômico é um teste valioso para estudos relacionados a neurobiologia da ansiedade (OLIVEIRA, 2012; SOARES, 2006; WLADIMIR, 2012).

Para análise da ansiedade, observa-se o percentual do número de entradas nos braços abertos, bem como seu tempo de permanência. Diversos estudos anteriores, discutiram e elaboraram hipóteses sobre a causa da aversão natural aos braços abertos que justificam sua possível relação com a ansiedade. Segundo Montgomery (1955), pode estar correlacionada ao ambiente desconhecido, conforme Grossen e Kelly (1972), na tentativa de se proteger de predadores aéreos e conforme Pellow (1986), devido ao medo de altura. (GROSSEN; KELLEY, 1972; MONTGOMERY; MONKMAN, 1955; PELLOW *et al.*, 1985).

Deste modo, pode-se compreender que a tendência natural do animal consiste em permanecer maior tempo nos braços fechados e por isso o tempo de permanência

nos braços abertos é um indicativo de ansiedade(MARTINEZ; GARCIA; MORATO, 2005; PELLOW *et al.*, 1985).

Os resultados dos testes Labirinto em Cruz elevado (Figura 6), demonstram que POUCB 5 + Naloxona foi o grupo com maior número de entrada nos braços fechados, enquanto que POUCB5(4x menor) apresenta maior número de entradas nos braços abertos.

Quanto ao tempo de permanência (Figura 7), os dados demonstram que POUCB 5 (4x menor) apresentou maior tempo de permanência nos braços abertos, possuindo diferença estatística significativa com  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina e  $p < 0,01$  em relação aos grupos morfina+ naloxona e POUCB 5+ naloxona.

Conforme Pellow, et al 1985, na ausência de um reforço no labirinto em cruz elevada, os animais possuem tendência menor a entrar e permanecer nos braços abertos, enquanto que quando submetidos a drogas ansiogênicas apresentavam maior incidência e permanência. (MORATO, 2006; PELLOW *et al.*, 1985).

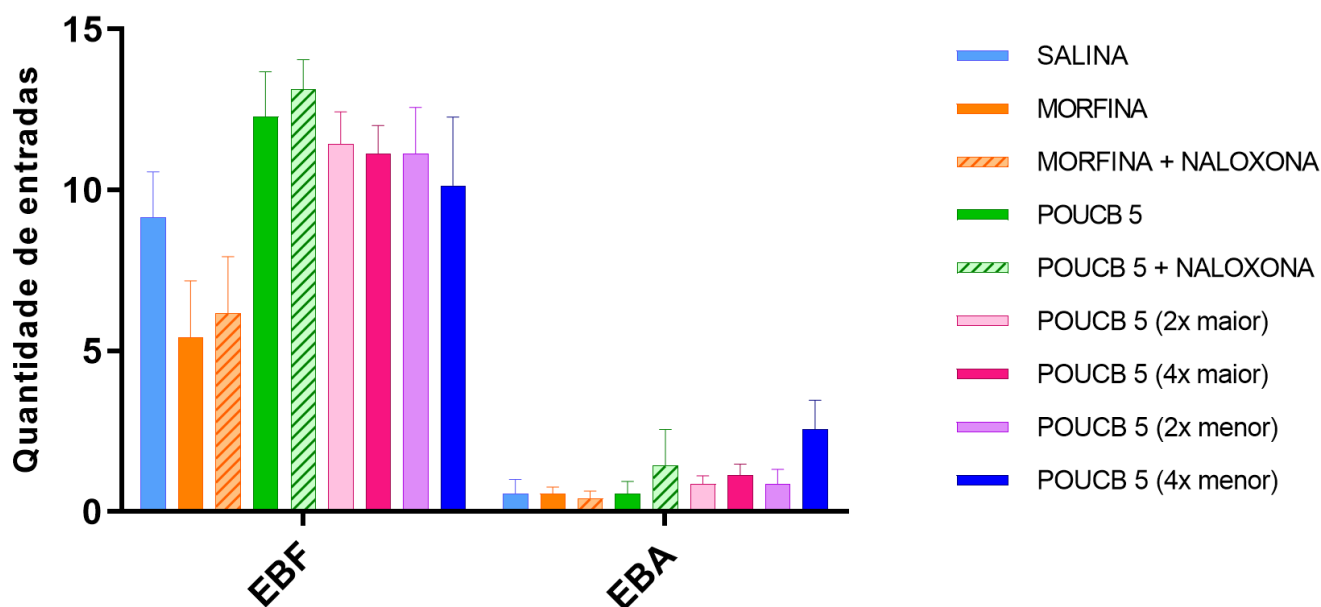


Figura 6: Efeito da administração do POUCBv5 avaliado no Teste Labirinto em cruz elevado durante 5 minutos sobre número de entradas nos braços fechados (EBF) e número de entradas nos braços abertos (EBA). Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão (n=7 animais por grupo), (ANOVA seguida do teste de Tukey).

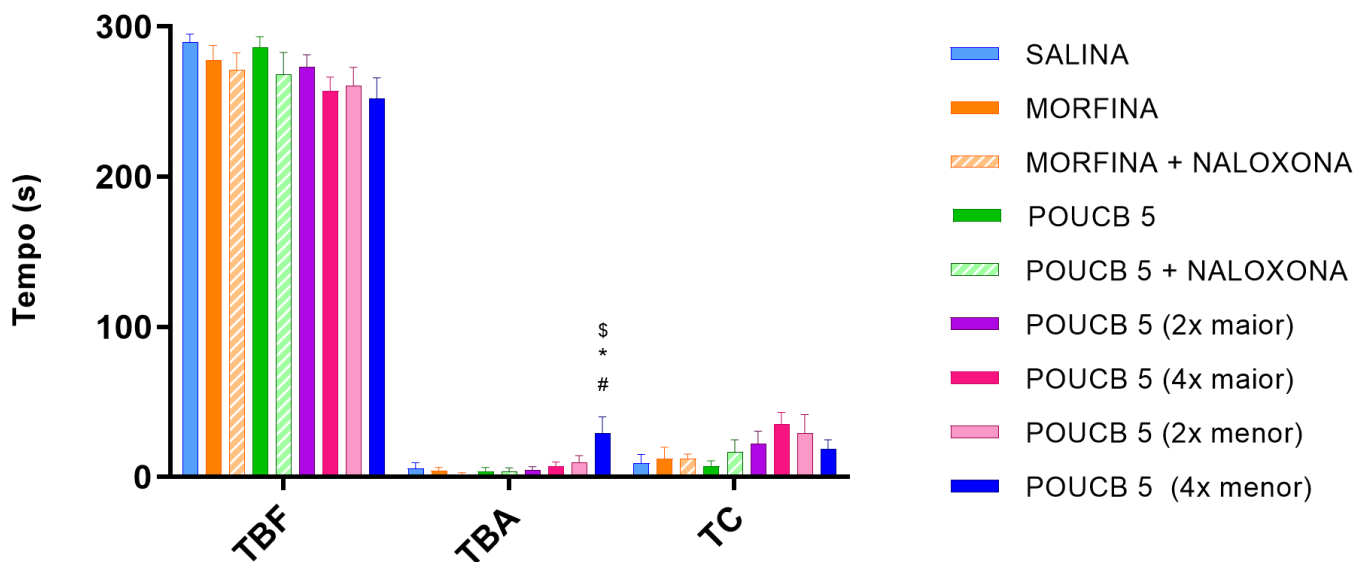


Figura 7 : Efeito da administração do POUCB 5 avaliado no Teste da cruz elevado durante 5 minutos sobre o tempo de permanência nos braços fechados (TBF), o tempo de permanência nos braços abertos (TBA), o tempo de permanência no centro (TC). Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão (n=7 animais por grupo), onde \* Morfina+ Naloxona < POUCB 5( 4x menor) com  $p < 0,01$ ; # POUCB 5+ Naloxona < POUCB 5 (4x menor) com  $p < 0,01$  e \$ POUCB 5 (4x menor) > salina com  $p < 0,05$ . (ANOVA seguida do teste de Tukey).

Ainda assim, embora POUCB (4x menor) tenha apresentado maior tempo de permanência nos braços abertos, na dosagem equimolar a morfina e em doses superiores, o peptídeo candidato não apresentou tempo de permanência superior aos grupos controle negativo e antagonista. Este fato pode também estar atribuído ao fato de que embora seja um teste convencional, diversas variáveis podem interferir na análise de dados, por envolver uma combinação de aspectos exploratórios (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; DEAKIN; GRAEFF, 1991).

Apesar de não existir diferenças significantes entre os grupos avaliados, a análise possui um recorte de tempo limitado, visto que os animais foram expostos apenas uma vez ao tratamento. No caso de opioides o efeito relacionado a ansiedade é descrito a partir do uso crônico desses fármacos ou intoxicação aguda. Por isso, não se pode excluir a possibilidade de possível efeito ansiogênico relacionado ao peptídeo candidato (BICCA *et al.*, 2012; NASCIMENTO; SAKATA, 2011).

Quando os animais foram avaliados no teste de Rota Rod, não foram observadas alterações na coordenação motora dos animais em nenhum dos tratamentos avaliados.

## CONCLUSÃO

- POUCB 5 apresentou efeito opioide em relação ao grupo Salina
- A partir da análise dos dados, POUCB 5 apresenta analgesia com  $p < 0,001$  em todos os instantes analisados; por possuir seu efeito antagonizado quando administrado com a naloxona;
- Do instante 120 minutos em diante, POUCB 5 demonstra índice de latência superior a morfina, podendo ser considerado fármaco em potencial;
- O peptídeo POUCB 5 (4x maior), apresentou índice de latência superior a morfina nos instantes 180, 210 e 240 minutos, com  $p < 0,001$  nos instantes 30 e 60 minutos;
- As dosagens 2x menor e 4x menor, não apresentaram diferença estatística entre si, assim como nas dosagens 2x maior e 4x maior.
- No teste de labirinto em cruz elevada, houve a permanência superior do POUCB 5 (4x maior), contudo, devido as dosagens superiores não terem apresentado valores conflitantes em relação ao controle negativo, sugere-se que fatores intrínsecos justifiquem esse resultado.
- Não foram observadas alterações na coordenação motora nos grupos avaliados.
- Estudos que avaliem a ansiedade relacionada ao uso crônico de opioides, são relevantes para o peptídeo candidato POUCB 5.
- Devido ao peptídeo não ter apresentado diferenças significativas quanto as diferentes doses analisadas, sabe-se que pelo perfil farmacocinético não necessariamente maiores doses correspondem a aumento de ação, por isso, estudos que viabilizem a otimização por diferentes formas farmacêuticas podem fornecer desempenhos promissores.

## REFERÊNCIAS

ABEN-ATHAR, Cintia Yolette Urbano Pauxis *et al.* Limitations in daily activities, risk awareness, social participation, and pain in patients with HTLV-1 using the SALSA and Participation scales. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 24, n. 6, p. 497–504, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.08.009>>.

BARFIELD, Elizabeth T. *et al.*  $\beta$ -Endorphin Modulates the Effect of Stress on Novelty-Suppressed Feeding. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 7, n. FEB, p. 1–7, 2013.

BENSEÑOR, Fábio Ely Martins; CICARELLI, Domingos Dias. Sedação e analgesia em terapia intensiva. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 53, n. 5, p. 680–693, 2003.

BICCA, C *et al.* Abuso e Dependência dos Opioides e Opiáceos. *Associação Brasileira de Psiquiatria*, p. 1–30, 2012.

BOUCHAKEL, Lydia. Patient therapeutic education. *Revue de l'Infirmiere*, v. 2017-Febru, n. 228, p. 53–54, 2017.

DE NONI, Ivano *et al.* Scientific Report of EFSA prepared by a DATEX Working Group on the potential health impact of  $\beta$ -casomorphins and related peptides. *EFSA Scientific Report*, v. 231, p. 1–107, 2009.

DUNHAM N. W.; MIYA T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal of the American Pharmacists Association*, [s.l.], v. 46, n. 3, p. 208-209, 1957. DOI: 10.1002/jps.3030460322.

FOSGERAU, Keld; HOFFMANN, Torsten. Peptide therapeutics: Current status and future directions. *Drug Discovery Today*, v. 20, n. 1, p. 122–128, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>>.

GALANTE, P; MORTARI, M R *Avaliação do efeito antinociceptivo em diferentes vias de administração e da interação farmacológica com receptores opioides e canabinoides da protonectina - F Avaliação do efeito antinociceptivo em diferentes vias de administração e da interação farmacol.* 2019.

GIROS, B. *et al.* The endogenous tripeptide Tyr-Gly-Gly as a possible metabolite of opioid peptides in rat brain: Identification, regional distribution, effects of lesions and formation in depolarized slices. *Peptides*, v. 7, n. 4, p. 669–677, 1986.

GROSSEN, NI E.; KELLEY, M. J. Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, v. 81, n. 2, p. 307–310, 1972.

IMBELONI, L E. Naloxona: Estado Atual Artigo de Revisão. *Rev Bras Anest*, v. 39, n. 2, p. 133–141, 1989.

MANN, Bimlesh *et al.* *Bioactive peptides from whey proteins*. [S.l.]: Elsevier Inc., 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00015-1>>.

MONTGOMERY, KC; MONKMAN, J A. The relation between war and exploratory behavior. 1955.

MORATO, S O Papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. *Psicologia USP*, v. 17, n. 4, p. 159–174, 2006.

NASCIMENTO, D C H; SAKATA, R K. Dependência de opioide em pacientes com dor crônica. *Revista Dor*, v. 12, n. 2, p. 160–165, 2011.

OLIVEIRA, Debora Alencar. *O Labirinto em Cruz Elevado como Modelo de Adicção Animal : Efeito Comportamental do Pareamento de Morfina com os Braços Abertos O Labirinto em Cruz Elevado como Modelo de Adicção Animal : Efeito Comportamental do Pareamento de Morfina com os Braços Abert*. 2012. 54 f. 2012. Disponível em:<[https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/10719/1/2012\\_DeborahAlencardeOliveira.pdf](https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/10719/1/2012_DeborahAlencardeOliveira.pdf)>.

PELLOW, Sharon *et al.* Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.

RAJA, Srinivasa N. *et al.* The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, v. 161, n. 9, p. 1976–1982, 2020.

RANG, HP *et al.* *FARMACOLOGIA*. [S.l.]: Elsevier, 1992. v. 12.

RIBEIRO, S; SCHIMIDT, A; SCHIMIDT, S R G. O Uso de Opióides no Tratamento da Dor Crônica. v. 52, p. 644–651, 2002.

SOARES, R. *IDENTIFICAÇÃO DOS EFEITOS ANALGÉSICOS E EMBRIOFETOTÓXICOS DO EXTRATO DAS FOLHAS DE Cissus*. 2006. 1–95 f. 2006. Disponível em: <[https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/8628/1/arquivo\\_8550\\_1.pdf](https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/8628/1/arquivo_8550_1.pdf)>.

TONELLO, R *et al.* Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , a dual blocker of TRPA1 and Cav2.2, as an adjuvant drug in opioid therapy for postoperative pain. *Toxicol*, v. 188, n. July, p. 80–88, 2020.

VINECKY, Felipe. *IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS OPIOIDES PRESENTES NA FRAÇÃO PROTEICA DE GRÃOS DE Coffea arabica*. 2015. 79 f. 2015.

VOLKOW, N; BENVENISTE, H MCLELLAN, A. Thomas. Use and Misuse of Opioids in Chronic Pain. *Annual Review of Medicine*, v. 69, p. 451–465, 2018..

WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, [s.l.], v. 80, n. 3, p. 300-307, 1944.

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Busca de sequências de peptídeos opiáceos em espécie vegetal**”, registrada com o nº **(006/19)**, sob a responsabilidade de **Simoni Campos Dias** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UCB) da Universidade Católica de Brasília, em reunião de 18/06/2019.

<b>Finalidade</b>	(X) Ensino ( ) Pesquisa Científica
<b>Vigência da autorização</b>	01 de abril de 2019.
<b>Espécie / linhagem/ raça</b>	<i>Mus musculus</i> –Balbc.
<b>Nº de Animais</b>	77
<b>Peso / Idade</b>	20g a 25g / 06 a 08 semanas
<b>Sexo</b>	Macho
<b>Origem</b>	Laboratório de Bioensaios

Brasília, 18 de junho de 2019.

