República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102017025126-8 A2

(22) Data do Depósito: 23/11/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 11/06/2019

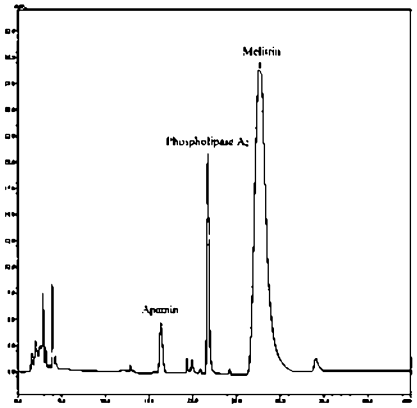
(54) Título: USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DAS DISCINESIAS

(51) Int. Cl.: A61K 35/64; A61P 29/00; A61P 39/06; A61P 25/00.

(71) Depositante(es): INSTITUTO DE TECNOLOGIA E PESQUISA; UNIVERSIDADE TIRADENTES.

(72) Inventor(es): MARGARETE ZANARDO GOMES; LUIZ PEREIRA DA COSTA; FRANCINE FERREIRA PADILHA; CAMILA GOMES DANTAS.

(57) Resumo: A presente invenção se refere, preferencialmente, ao uso do veneno de abelhas africanizadas (Apis mellifera Linnaeus), com potente atividade anti-inflamatória, antioxidante, neuroprotetora e largo espectro de ação sobre o Sistema Nervoso Central, com ação terapêutica sobre as discinesias induzidas por levodopa, reduzindo a debilidade motora e restaurando a mobilidade funcional, com ação sobre o sistema dopaminérgico.



USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DAS DISCINESIAS

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se refere, preferencialmente, ao uso do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellifera Linnaeus*), com potente atividade anti-inflamatória, antioxidante, neuroprotetora e largo espectro de ação sobre o Sistema Nervoso Central, com ação terapêutica sobre as discinesias induzidas por levodopa, reduzindo a debilidade motora e restaurando a mobilidade funcional, com ação sobre o sistema dopaminérgico, a qual compreende os referidos compostos e um veículo farmaceuticamente aceitável.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

[002] A doença de Parkinson (DP) configura-se como segunda doença neurodegenerativa mais frequente em todo o mundo, depois da doença de Alzheimer (CHEN et al., 2015; LIU et al., 2016). Considerada uma desordem neurodegenerativa progressiva e incapacitante (CHUNG et al., 2012), a enfermidade é caracterizada pela perda contínua (maior que 80%) de neurônios dopaminérgicos na parte compacta da substância negra (SNc), implicando na diminuição de dopamina na via nigroestriatal (BALTAZAR et al., 2014).

[003] A terapia de reposição dopaminérgica, atualmente, é o tratamento mais efetivo para a DP e compreende principalmente a administração da levodopa -L-DOPA- (AQUINO; FOX, 2015; RODRÍGUEZ-BLÁZQUEZ et al., 2015). Contudo, o uso contínuo e prolongado deste precursor de dopamina resulta em complicações motoras, incluindo flutuações motoras e movimentos involuntários conhecidos como discinesias induzidas por L-DOPA (LIDs) (DU; CHEN et al., 2017). Dados epidemiológicos indicam que as LIDs são observadas em mais de 50% dos pacientes que receberam terapia com L-DOPA por 4

a 6 anos e em mais de 90% dos pacientes tratados por 10 anos (SHUKLA, 2017). Além da duração da terapia com L-DOPA e dose administrada, a gravidade da doença e a idade de início da doença, são outros fatores de risco importantes (MANSON et al., 2012; SHUKLA, 2017).

[004] Estudos apontam que pacientes jovens, diagnosticados com DP, tiveram início precoce de administração de L-DOPA e maior taxa de desenvolvimento de LIDs (MANSON et al., 2012; SHUKLA, 2017). Estes dados justificam a urgência pela investigação de tratamentos efetivos para esta condição, uma vez que acomete indivíduos em idade ativa, comprometendo sua funcionalidade, independência e qualidade de vida (COELHO, 2017).

[005] O veneno de abelhas tem apresentado efeito neuroprotetor sobre doenças que acometem o Sistema Nervoso Central, especificamente sobre desordens neurodegenerativas (HWANG et al., 2015; MAURICE et al., 2015; YE et al., 2016), sem nenhuma citação na literatura acerca de sua ação sobre as LIDs. Também denominada apitoxina, a substância consiste em aproximadamente 18 componentes farmacologicamente ativos, incluindo uma variedade de peptídeos como melitina, apamina, adolapina, peptídeo degranulador de mastócitos (MCD), enzimas (fosfolipase A_2 e hialuronidase), aminas bioativas (histamina e epinefrina), outros componentes não-peptídeos (lipídios, carboidratos e aminoácidos), minerais e compostos voláteis (AL-ANI et al., 2015). Adicionalmente, sua composição química pode variar entre regiões geográficas, visto que abelhas da espécie *Apis mellifera L.*, existentes no Brasil e em países da América Latina, também identificadas como abelhas africanizadas por apresentarem caráter poli híbrido, apresentam veneno com perfil químico diferenciado em relação às abelhas europeias, mais amplamente estudadas (SCIANI et al., 2010; FERREIRA-JUNIOR et al., 2010; PARK et al., 2014).

[006] Até o momento, não constam estudos acerca da utilização do veneno de abelhas (africanizadas ou europeias) para o tratamento das LIDs, um problema debilitante, que reduz significativamente a qualidade de vida dos indivíduos acometidos, após uso contínuo da levodopa. Deste modo, a utilização do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellifera L.*) configura-se como uma proposta inovadora para o tratamento desta desordem

ESTADO DA TÉCNICA

[007] A literatura técnica especializada revela alguns documentos de patentes que fazem referência ao uso do veneno de abelha africanizada (*Apis mellifera L.*) para tratamento do efeito colateral causado pela L-DOPA. Para embasar o critério de novidade e atividade inventiva, foi realizada uma pesquisa na base de patentes do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) que compila o acervo de patentes depositadas do Brasil, e na base europeia de Patentes (Espacenet) que compila o acervo de patentes depositadas em mais de 90 países. Na pesquisa realizada não foi identificado nenhum documento de patente que faz referência ao uso do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellifera L.*) para o tratamento das discinesias induzidas por levodopa

[008] Os documentos de maior relevância serão descritos a seguir, entretanto, é importante deixar claro que nenhum deles fere o quesito de novidade da patente de invenção requerida nesse documento, tendo em vista que o conceito inventivo aqui proposto difere consideravelmente dos documentos citados e revelados.

[009] O documento PI 1005539-8 refere-se a composições farmacêuticas contendo fração isolada de apitoxina de abelhas, de baixa alergenicidade, com propriedades analgésicas e antiinflamatórias, para serem usadas no tratamento de pacientes com atrite reumatóide ou outras condições inflamatórias e dolorosas.

[0010] O documento PI 0904036-6 refere-se a um processo de obtenção de matéria prima e de componentes isolados de apitoxina de abelhas *Apis mellifera* de baixa alergenicidade em escala industrial, com propriedades analgésicas e antiinflamatórias para ser incorporado em formas farmacêuticas semi-sólidas ou líquidas, preferencialmente pomada, creme ou géis. Mais particularmente a invenção ora descrita pode ser usada no tratamento de artrite reumatóide e de outros distúrbios inflamatórios e dolorosos

[0011] Assim, e a partir dos documentos revelados, ressalta-se que o desenvolvimento do **'USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DAS DISCINESIAS'** proposto neste documento de patente de invenção, possui potencial inovador, e, portanto, atende ao critério de novidade, pois até o presente momento nenhum trabalho científico ou técnico compreendido no estado da técnica possui a tecnologia de desenvolvimento, uso e aplicação semelhantes do que é revelado e requerido.

[0012] Por fim, é importante destacar que a tecnologia proposta neste documento de patente de invenção apresenta também os outros critérios de patenteabilidade, como atividade inventiva e aplicação industrial, requisitos estes necessários para a concessão da patente requerida.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0013] A presente invenção refere-se à utilização do veneno extraído de abelhas africanizadas (*Apis mellifera L.)*. O produto apresenta potente atividade anti-inflamatória, antioxidante, neuroprotetora e largo espectro de ação sobre o Sistema Nervoso Central, com ação terapêutica sobre as discinesias induzidas por levodopa, reduzindo a debilidade motora e restaurando a mobilidade funcional, com ação sobre o sistema dopaminérgico.

[0014] A aplicação do veneno de abelhas *Apis mellífera L.*, sobre as discinesias decorrentes do uso contínuo da L-DOPA, através da interação com a via nigroestriatal dopaminérgica, minimiza a ocorrência dos efeitos debilitantes ocasionados por este medicamento, largamente utilizado por indivíduos com doença de Parkinson. Desta forma, esta invenção consiste numa terapêutica medicamentosa inédita

[0015] A invenção proposta busca o preenchimento de uma lacuna farmacêutica e tecnológica, em termos da aplicação do veneno de abelhas africanizadas como elemento ativo de composições farmacêuticas, além de propor melhorar a biodisponibilidade deste produto, promovendo ação terapêutica inédita para tratamento das discinesias induzidas por levodopa, possivelmente devido às suas interações o sistema dopaminérgico

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURA

[0016] A figura 1 anexa apresenta cromatograma de HPLC (λ= 280 nm) do veneno de abelhas (BV) africanizadas (*Apis mellífera L.*) proveniente do estado do Rio Grande do Norte/ Brasil

[0017] A figura 2 anexa apresenta uma representação do resultado da atividade antioxidante do veneno de abelhas (BV) africanizadas (*Apis mellífera L.*) obtida por meio do método de sequestro de radicais livres evidenciando o IC50.

[0018] A figura 3 anexa apresenta o resultado do parâmetro de Discinesia de Pata no teste de Movimentos Involuntários Anormais (AIMS's). *(p<0,1); ***(p<0,001) em relação ao dia 2. Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's..

[0019] A figura 4 anexa apresenta o resultado do parâmetro de Discinesia Axial no teste de Movimentos Involuntários Anormais (AIMS's). **(p<0,01); ***(p<0,001) em relação ao dia 2. Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's.

[0020] **A figura 5** anexa apresenta o resultado do parâmetro de Discinesia Mandibular no teste de Movimentos Involuntários Anormais (AIMS's). *(p<0,1) em relação ao dia 2. Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's.

[0021] A figura 6 Resultado do parâmetro de Rotações no teste de Movimentos Involuntários Anormais (AIMS's). *(p<0,1); **(p<0,01); ***(p<0,001) em relação ao dia 2, #(p<0,1); ##(p<0,01) em relação ao dia 8. Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's.

[0022] A **figura 7** anexa apresenta o resultado do teste do Cilindro. As colunas representam as médias de contatos contralaterais em cada grupo e as barras representam o erro padrão da média. Cont. vs BV 0,5 *(p<0,1); Cont. vs BV 1 ***(p<0,001); Cont. vs lesão ****(p<0,0001); Lesão vs BV 0,1 #(p<0,001). Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's.

[0023] A **figura 8** anexa apresenta o resultado do teste de Comportamento Rotatório. As colunas representam as médias de rotações contralaterais nos grupos e as barras representam o erro padrão da média. Cont. vs BV 0,1 e Cont. vs BV 1 *(p<0,1); Cont. vs BV 0,5 **(p<0,01); Cont. vs Lesão ****(p<0,0001), Lesão vs BV 0,1; Lesão vs BV 0,5; Lesão vs BV 1 e Lesão vs Amantadina #(p<0,0001). ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey's.

[0024] A **figura 9** anexa apresenta o resultado do teste de Suspensão em Fio. As colunas representam o tempo de preensão, em segundos, de cada grupo e as barras representam o erro padrão da média. Cont. vs BV 1 *(p<0,1), Lesão vs Amantadina #(p<0,1); BV 0,1 vs BV 0,5 Δ(p<0,1); Lesão vs BV 0,1 **(p<0,01); Cont. vs BV 0,5 ***(p<0,001) e Cont. vs Lesão ****(p<0,0001). ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey's.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0025] Nesta seção serão revelados todos os detalhes sobre o **USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DAS DISCINESIAS**, cujo intuito é o de descrever de modo suficiente e claro, todas as etapas que envolvem o processo, e dessa forma, embasar a suficiência descritiva desta invenção. Assim, conforme mencionado anteriormente, a presente invenção refere-se à utilização do veneno extraído de abelhas africanizadas (*Apis mellifera L.*). O produto apresenta potente atividade anti-inflamatória, antioxidante, neuroprotetora e largo espectro de ação sobre o Sistema Nervoso Central, com ação terapêutica sobre as discinesias induzidas por levodopa, reduzindo a debilidade motora e restaurando a mobilidade funcional, com ação sobre o sistema dopaminérgico.

[0026] É importante destacar que o veneno de abelha tem qualidades que permitem selecioná-lo para utilização do mesmo com elevado potencial terapêutico e atividade anti-inflamatório.

[0027] A aplicação do veneno de abelhas *Apis mellífera L.*, sobre as discinesias decorrentes do uso contínuo da L-DOPA, através da interação com a via nigroestriatal dopaminérgica, minimiza a ocorrência dos efeitos debilitantes ocasionados por este medicamento, largamente utilizado por indivíduos com doença de Parkinson. Desta forma, esta invenção consiste numa terapêutica medicamentosa inédita.

[0028] O invento proposto oferece aumento significativo do controle da atividade motora. A dose de administração é na faixa de 0,1 a 1 $mg.Kg^{-1}$, preferencialmente de 0,1 $mg.Kg^{-1}$, enquanto a dose usual do medicamento de escolha para tratamento das discinesias induzidas por levodopa (cloridrato de amantadina) é de 100 mg, de 12 em 12 horas, com possibilidade de aumento da dosagem, se necessário. O fabricante do cloridrato de amantadina recomenda ainda, combinação com outras medicações antiparkinsonianas anticolinérgicas e/ou com levodopa, afim

de obter benefício adicional, incluindo redução nas flutuações motoras, similares as que ocorrem no tratamento inicial da levodopa.

[0029] O veneno de abelhas foi comprado de um apiário na cidade de Natal - RN, na região Nordeste do Brasil, obtido por extração elétrica. A técnica consiste na colocação de um coletor, composto por placas de vidro e gerador de pulsos, conectado a bateria ou a outra fonte de energia, no alvado da colmeia. Quando as abelhas pousam sobre a placa, recebem um choque e reagem no intuito de ferroar a placa coletora elétrica, depositando uma carga de veneno entre o vidro e o material protetor do equipamento, local onde seca e depois é raspado e vendido para a indústria farmacêutica ou laboratório especializado, por exemplo, para ser utilizado (ZHOU et al., 2010; DUSSART; BARTHOLOMÉ, 2007; GRAMACHO et al., 1992; HIDER, 1988)

[0030] Para indução do modelo experimental das discinesias induzidas por levodopa foram utilizados os seguintes produtos químicos comerciais: 6-hidroxidopamina (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil), L-3,4-dihidroxifenilalanina (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil), Cloridrato de Benserazida (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil), hidrocloreto de Apomorfina (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil). Para análise cromatográfica foram utilizados: apamina, melitina e fosfolipase A_2 (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil). Para análise comparativa do efeito farmacológico com o veneno de abelhas, foi utilizado: Amantadina (Eurofarma Laboratórios S.A., São Paulo, Brasil)

[0031] O processo para utilização do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellifera L.*) consistiu nas seguintes etapas:

ETAPA 1 → OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO

[0032] O veneno de abelhas foi comprado sob a forma de pó, de um apiário na cidade de Natal - RN, na região Nordeste do Brasil, obtido por extração elétrica. A técnica consiste na colocação de um coletor,

composto por placas de vidro e gerador de pulsos, conectado a bateria ou a outra fonte de energia, no alvado da colmeia. Quando as abelhas pousam sobre a placa, recebem um choque e reagem no intuito de ferroar a placa coletora elétrica, depositando uma carga de veneno entre o vidro e o material protetor do equipamento, local onde seca e depois é raspado e vendido para a indústria farmacêutica ou laboratório especializado, por exemplo, para ser utilizado (ZHOU et al., 2010; DUSSART; BARTHOLOMÉ, 2007; GRAMACHO et al., 1992; HIDER, 1988).

[0033] O produto foi armazenado em frasco âmbar e sob refrigeração entre 5 ºC e 15 ºC, preferencialmente10 ºC.

ETAPA 2 → DISSOLUÇÃO

[0034] Para utilização, o veneno foi diluído em solução salina estéril (0,9%), com obtenção de pH entre 4,5 e 5,5, preferencialmente 5,0. Após diluição, o veneno foi armazenado em frasco âmbar e sob refrigeração entre 5 ºC e 15 ºC, preferencialmente 10 ºC.

ETAPA 3 →APLICAÇÃO

[0035] O veneno foi administrado via subcutânea (s.c.), em volume entre 35 e 45 µL, preferencialmente 40 µL, uma vez a cada dois dias, por 2 semanas.

Análise por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

[0036] O veneno de abelhas (5 a 15 mg, preferencialmente 10 mg) foi diluído em 5 a 15 mL, preferencialmente 10 mL de ácido trifluoracético (0,1% em água milli-Q). A solução (concentração: 1 $mg.mL^{-1}$) foi centrifugada com velocidade entre 10000 a 15000 rpm, preferencialmente 12000 rpm, por 5 a 15 minutos, preferencialmente 10 minutos (3 a 5 ºC, preferencialmente 4 ºC) e todo o sobrenadante (aproximadamente 9 mL) foi coletado para análise por HPLC. Anteriormente a injeção no HPLC, a amostra foi filtrada em filtro de membrana (0,45 µm - PTFE).

[0037] A análise por HPLC foi realizada utilizando o sistema de cromatografia líquida de alta performance que consistiu em um desgasificador DGU-20A3, duas bombas LC-20AD, um auto injetor SIL-20A HT, forno de coluna CTO-20A, detector de matriz de fotodiodo SPDM20Avp (DAD) e um controlador de sistema CBM-20A (Shimadzu Co., Kyoto, Japan). A separação cromatográfica foi realizada utilizando coluna analítica C18 Phenomenex Luna® 4,6 x 250 mm (tamanho da partícula: 5 µm).

[0038] A fase móvel consistiu em um gradiente de: A: ácido trifluoracético (0,1% em água milli-Q) e B: acetonitrila. A taxa de fluxo da fase móvel foi 0,8 $mL.min^{-1}$ e o volume de injeção da amostra foi 20 µL. O gradiente de eluição começou com 5 % de B por 7 minutos, 5 – 10 % de B durante 7 – 10 minutos, 10 – 17 % de B durante 10 – 15 minutos, 17 – 25 % de B durante 15 – 20 minutos, 25 – 35 % de B durante 20 – 33 minutos, 35 – 40 % de B durante 33 – 39 minutos, 40 – 5 % de B durante 39 – 45 minutos, retornando às condições iniciais e finalizando a análise. O detector (HPLC – DAD) foi ajustado em 280 nm para análise de picos.

[0039] Os compostos foram identificados através de co-injeções de padrões comparando os tempos de retenção. Apamina, melitina e fosfolipase A_2 foram obtidas da Sigma-Aldrich® e diluídas com água milli-Q até 200 $\mu g.mL^{-1}$ (solução de estoque). As amostras foram filtradas em filtro de membrana (0,45 µm - PTFE), antes das injeções de HPLC. A análise quantitativa foi realizada através de curvas de calibração de cada composto padrão identificado. As curvas foram preparadas em sete diferentes concentrações: 0,8; 4; 8; 12; 16; 20 e 50 $\mu g.mL^{-1}$. Todas as amostras foram filtradas em filtro de membrana (0,45 µm - PTFE) antes da injeção de HPLC e foram analisadas em triplicata.

Avaliação da atividade sequestrante de radical DPPH

[0040] A atividade antioxidante foi determinada utilizando a metodologia proposta por Brand-Willians et al. (1995) com algumas

adaptações. Para tanto, a partir do preparo da solução estoque do radical livre DPPH 60 M (2,4 mg de DPPH dissolvidos em 100 mL de metanol) foi preparada a solução de trabalho contendo a mistura de 30 µL das diluições do veneno de abelhas africanizadas e 3 mL da solução de DPPH. A mistura foi incubada por 10 min. no escuro para posterior leitura das absorbâncias a 520 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em mmol Trolox/g de massa fresca da amostra e os ensaios foram realizados em triplicata.

[0041] A equação 1 foi utilizada para calcular a porcentagem de inibição do radical livre DPPH pela amostra. Posteriormente foi obtida a concentração capaz de inibir 50% das moléculas de DPPH em solução (concentração inibitória-IC50), utilizando regressão não linear (OLDONI et al., 2011).

$$I\ \% = \frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} X100$$

(Equação 1)

Onde:

I = Porcentagem de inibição;

Acontrole = Absorbância da solução de DPPH sem amostra;

Aamostra = Absorbância da amostra com o DPPH.

Ensaio biológico

Animais e instruções éticas

[0042] Camundongos albinos suíços do sexo masculino (25-30 g) foram mantidos em ambiente controlado de temperatura, em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 horas e com livre acesso a água e comida. Todos os procedimentos estiveram de acordo com as normas do

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tiradentes, Aracaju- SE, Brasil (aprovação sob o número 01052017).

Indução da lesão no feixe prosencefálico medial (MFB) com 6-hidroxidopamina (6-OHDA)

[0043] Os animais foram previamente anestesiados com ketamina/ xilazina (150 e 15 $mg.Kg^{-1}$, respectivamente, i.p.) e, em seguida, posicionados no aparelho estereotáxico (Insight®, Brasil) com fixação dos ossos temporais e aparelho mandibular, para administração de 0, 02 mL de anestésico local (lidocaína 3% contendo epinefrina a 2%), via s.c., na região dorsal da cabeça.

[0044] Em seguida, foram submetidos a cirurgia estereotáxica para microinjeção de 1 $\mu g.\mu l^{-1}$ de solução com 6-OHDA ou de solução salina estéril (0,9%) contendo 0,02% de ácido ascórbico (lado esquerdo) utilizando uma micro seringa Hamilton 705 (10 µl) acoplada ao aparelho estereotáxico e a bomba de infusão BI-2008, nas seguintes coordenadas (em mm em relação ao bregma, sutura sagital e da superfície dural): AP: - 0,1, L: +0,11, DV: - 0,5 (HUOT et al., 2013; FISONE; BEZARD, 2011). As injeções foram realizadas a uma taxa de 0,5 µl/ min.

[0045] Ao final do procedimento cirúrgico foi realizada sutura com fio Shalon® suturas, de nylon 3 cm, cuticular, e aplicada injeção intramuscular de pentabiótico veterinário para animais de pequeno porte (Pencivet Plus PPU, 0,04 mL). Em seguida, os animais foram aquecidos em câmara térmica a 37 °C, para recuperação da anestesia e, para evitar a desidratação, receberam solução estéril de glicose-salina (50 $mg.mL^{-1}$, Baxter Medical AB, 0,1 mL/10 g de massa corporal, via s.c) imediatamente após a cirurgia e uma vez por dia durante a primeira semana pós-operatória. Quando necessário, esse tratamento foi mantido

por dias alternados até a segunda semana pós-operatória. Adicionalmente, os animais receberam comida sob a forma de *pellets* embebidos em solução de água/15% açúcar, duas vezes ao dia (FRANCARDO et al., 2011).

[0046] Duas semanas após a lesão por 6-OHDA, os camundongos foram avaliados com o teste do cilindro para determinar o grau de assimetria das patas anteriores induzida pela lesão (SUAREZ et al., 2014; FRANCARDO et al., 2011). No dia seguinte ao teste, os animais receberam injeções de levodopa.

Tratamento com levodopa (L-DOPA)

[0047] A levodopa (L-DOPA) e a benserazida foram dissolvidas em soro fisiológico imediatamente antes da utilização. As drogas foram injetadas no volume de 0,1 mL/ 10 g de massa corporal, via i.p. Cada dose de levodopa (6 $mg.Kg^{-1}$ durante 5 dias e 12 $mg.Kg^{-1}$ durante 10 dias) foi combinada com uma dose de 12 $mg.Kg^{-1}$ de benserazida. Os animais receberam o fármaco por 15 dias e foram avaliados no 2°, 5°, 8°, 11° e 14° dia após a primeira administração de levodopa (CENCI et al., 1998; LUNDBLAD et al., 2004, FRANCARDO et al., 2011) com o teste de movimentos involuntários anormais. No 8° e 14° dias de administração de levodopa, os animais também passaram pelo teste do cilindro.

Tratamento com veneno de abelhas, amantadina ou salina

[0048] Os tratamentos foram realizados mediante administração do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*) na faixa de 0,1 a 1 $mg.Kg^{-1}$, preferencialmente 0,1; 0,5 ou 1 $mg.Kg^{-1}$, via s.c. (DOO et al., 2010; KHALIL et al., 2014; CAI et al., 2015), amantadina na dose de 40 $mg.Kg^{-1}$, via oral (SEBASTIANUTTO et al., 2016), ou salina (40 µl), via s.c. (KIM et al., 2011), de acordo com os grupos experimentais supracitados. O tratamento foi realizado 1 vez a cada 2 dias, a partir do último dia de administração de L-DOPA, por 2 semanas (DOO et al., 2010; YANG et al., 2010; KHALIL et al., 2014; CAI et al., 2015).

[0049] Os efeitos funcionais foram caracterizados por meio dos seguintes testes comportamentais: teste do cilindro, comportamento rotatório e suspensão em fio, no dia seguinte a última administração de veneno de abelhas. Durante todo o experimento foram monitorados ganho de peso e ingestão de água dos animais.

Testes comportamentais

[0050] Foram realizados os seguintes testes comportamentais: Avaliação dos movimentos involuntários anormais (FRANCARDO et al., 2011), Teste do cilindro (FRANCARDO et al., 2011), comportamento rotatório (SMITH et al., 2012) e suspensão em fio (WRANGEL et al., 2015).

[0051] **Movimentos involuntários anormais (AIMs):** Os movimentos involuntários anormais foram classificados de acordo com Francardo et al. (2011). Cada animal foi observado individualmente por 1 min. a cada 20 min., durante 2 h, com início 20 min. após a administração de levodopa/ benserazida (ou salina). Somente movimentos hipercinéticos e distônicos foram considerados nas avaliações. Os movimentos foram classificados em três subtipos diferentes com base em sua distribuição topográfica: (i) axial: desvio do tronco, pescoço e cabeça para lado contralateral à lesão, levando à perda do equilíbrio ortostático; (ii) orofacial: movimentos da mandíbula e protrusão de língua contralateral; (iii) Menor movimento do membro anterior contralateral, às vezes combinado com o movimento de agarrar da pata. Ainda, foram avaliadas as rotações contralaterais. Cada um dos subtipos foi marcado em uma escala de severidade de 0 a 4, onde: 0 = ausente; 1 = presente durante menos de metade do período de observação; 2 = apresenta-se durante mais de metade do período de observação; 3 = apresenta-se durante todo o período, mas é suprimido por estímulos sensoriais; 4 = apresenta-se constantemente independente de estímulos sensoriais.

[0052] **Teste do cilindro (CT):** O teste consiste na avaliação de déficits comportamentais (grau de assimetria das patas anteriores induzida pela lesão) e foi empregado de acordo com Francardo et al. (2011). Este teste utiliza a frequência para avaliar a atividade locomotora. Os roedores foram colocados individualmente em um cilindro de vidro com 10 cm de diâmetro e 14 cm de altura, localizado em frente a dois espelhos verticais, para visualizar os animais em todos os ângulos, e observados por 2 minutos. O teste foi registrado em vídeo e foram avaliados os números de contatos dos membros anteriores ipsi e contralaterais a lesão.

[0053] **Comportamento rotatório (CR):** Consiste em analisar a intensidade da lesão provocada pela 6-OHDA. Neste teste, o avaliador observa e quantifica o número e o sentido de giros de 360° realizados pelos animais ao redor do eixo do próprio corpo, contralateral ou ipsi lateral à lesão, após a administração de hidrocloreto de apomorfina, importante agonista dopaminérgico. É necessário observar a decorrência de tempo suficiente para manifestação do CR, uma vez que depende do aumento da sensibilidade sináptica, mecanismo compensatório à lesão (SMITH et al., 2012).

[0054] **Teste de suspensão em fio:** O teste objetiva verificar anormalidades neuromusculares mediante a capacidade do animal de sustentar seu próprio corpo no fio, o que requer força de preensão. O aparelho utilizado consiste num fio de cobre, com 2 mm de diâmetro, suspenso horizontalmente entre duas barras de madeira com 40 cm de altura, organizadas perpendicularmente ao chão e a 80 cm de distância uma da outra. Na base do equipamento foi colocada uma caixa plástica contendo maravalha, com o intuito de amortecer o impacto do animal no momento da queda.

[0055] O animal foi conduzido pelo avaliador até o fio para que pudesse colocar nele as patas dianteiras. A partir deste momento foi medido o tempo total que o animal permaneceu no fio. O cronômetro foi

interrompido imediatamente após a queda do animal e o tempo de permanência registrado (ABDEL-SALAM et al., 2014; WRANGEL et al., 2015).

Eutanásia e Procedimentos Histológicos

[0056] Após a última administração do veneno de abelhas, amantadina ou salina, que foi seguida dos testes comportamentais supracitados, os animais foram submetidos à eutanásia por anóxia em câmara de gás CO_2 e tiveram os encéfalos retirados para posterior análise histológica (TAVARINI et al., 2011; FRANCARDO et al., 2011).

RESULTADOS

[0057] O cromatograma apresentou picos com boa separação e resolução (Figura 1). Os compostos apamina, fosfolipase A_2 e melitina foram identificados na amostra analisada nos tempos de retenção de 16, 21 e 28 minutos, respectivamente. As curvas de calibração preparadas para a análise quantitativa apresentaram coeficiente de correlação (r) ≥ 0,999 (intervalo linear de 1 a 50 $\mu g.mL^{-1}$). O conteúdo dos compostos foi listado na Tabela 1.

Tabela 1: Conteúdo ($\mu g.mL^{-1}$) dos compostos presentes no veneno de abelhas africanizadas - *Apis mellífera L.*- (Média ± desvio padrão; n = 3).

Compostos	**Veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*)**
Apamina	14.90 ± 0.15
Melitina	191.32 ± 0.07
Phospholipase A_2	69.12 ± 0.16

[0058] Para avaliar a capacidade antioxidante da amostra de veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*) foram utilizadas concentrações entre 1 a 15 mg/mL. A amostra apresentou capacidade de sequestrar 50% (IC 50) de radicais livres na concentração de 11 mg/mL (Figura 2).

[0059] No teste de avaliação dos movimentos involuntários anormais, no que se refere ao parâmetro de discinesia de pata, observa-se que houve aumento significativo deste comportamento no 11º dia em relação ao 2º dia de administração de L-DOPA ($p<0,1$) e no 14º dia também em relação ao 2º dia ($p<0,001$). Estes dados podem ser observados na Figura 3.

[0060] No parâmetro de discinesia axial, observa-se que houve aumento significativo deste comportamento no 11º dia em relação ao 2º dia de administração de L-DOPA ($p<0,01$) e no 14º dia em relação ao 2º dia ($p<0,001$). Estes dados podem ser observados na Figura 4.

[0061] No parâmetro de discinesia mandibular, observa-se que houve aumento significativo deste comportamento no 11º dia em relação ao 2º dia de administração de L-DOPA ($p<0,1$). Este dado pode ser observado na Figura 5.

[0062] No parâmetro de rotação, observa-se que houve aumento progressivo e significativo deste comportamento no 5º dia ($p<0,1$), no 11º dia ($p<0,01$) e no 14º dia ($p<0,001$) em relação ao 2º dia de administração de L-DOPA. Houve, ainda, aumento significativo de rotações no 11º dia ($p<0,1$) e no 14º dia ($p<0,01$) em relação ao 8º dia ($p<0,001$). Estes dados podem ser observados na Figura 6.

[0063]. No teste do cilindro, os animais do grupo lesão e dos grupos que receberam veneno de abelhas nas doses de 0,5 e 1 $mg.Kg^{-1}$, reduziram significativamente o número de contatos com a pata contralateral a lesão em relação ao grupo controle ($p<0,0001$; $p<0,1$; $p<0,001$, respectivamente). Em contrapartida, animais que receberam o veneno de abelhas na dose de 0,1 $mg.Kg^{-1}$ apresentaram aumento

significativo deste parâmetro em relação ao grupo lesão ($p<0,001$). Estes dados podem ser observados na Figura 7 (ANOVA, $F_{5-54}= 17,07$).

[0064] No teste de comportamento rotatório, o grupo lesão e todos os grupos testados com diferentes doses do veneno de abelhas (BV 0,1 $mg.Kg^{-1}$; BV 0,5 $mg.Kg^{-1}$ e BV 1 $mg.Kg^{-1}$) apresentaram aumento significativo das rotações contralaterais a lesão em relação ao grupo controle ($p<0,0001$; $p<0,1$; $p<0,01$ e $p<0,1$). Ademais, todos os grupos tratados apresentaram redução rotacional significativa em relação ao grupo lesão ($p<0,0001$ em todas as comparações). Estes dados podem ser observados na Figura 8.

[0065] No teste de suspensão em fio, o grupo lesão reduziu significativamente o tempo de permanência no equipamento, denotando menor força de preensão, em relação ao grupo controle ($p<0,0001$). Também foi observada redução significativa deste parâmetro nos grupos que receberam o veneno nas doses de 0,5 $mg.Kg^{-1}$ e 1 $mg.Kg^{-1}$ em relação ao grupo controle ($p<0,001$; $p<0,1$, respectivamente). Todavia, animais que receberam a dose de 0,1 $mg.Kg^{-1}$ de veneno de abelhas, apresentaram aumento significativo da força de preensão em relação ao grupo lesão ($p<0,01$). Este aumento significativo também foi observado no grupo amantadina, em relação ao grupo lesão ($p<0,1$). Ademais, a menor dose testada apresentou aumento significativo de eficácia neste teste em comparação a dose de 0,5 $mg.Kg^{-1}$ ($p<0,1$). Estes dados podem ser observados na Figura 9.

[0066] Desta forma, sugere-se que houve ação neuroprotetora do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellifera L.*), com dose na faixa entre 0,1 a 1 $mg.Kg^{-1}$, especialmente de 0,1 $mg.Kg^{-1}$, verificado pelos resultados comportamentais observados após tratamentos.

REIVINDICAÇÕES

1- **USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DAS DISCINESIAS**, caracterizado pelo tratamento ser utilizado de maneira isolada para tratamento das discinesias induzidas por levodopa em dose de 0,1 a 1 $mg.Kg^{-1}$, preferencialmente de 0,1 $mg.Kg^{-1}$.

2- **USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DAS DISCINESIAS,** caracterizado por a espécie da abelha africanizada ser identificada como *Apis mellifera Linnaeus.*

3- **USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DAS DISCINESIAS**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a etapa 1, o referido veneno da abelha *Apis melífera L.* ser obtido através de extração elétrica e armazenado em frasco âmbar sob refrigeração entre 5 ºC e 15 ºC, preferencialmente10 ºC.

4- **VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DAS DISCINESIAS**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por, na etapa 2, ser diluído em solução salina estéril (0,9%), com obtenção de pH entre 4,5 e 5,5, preferencialmente 5,0 e armazenado em frasco âmbar e sob refrigeração entre 5 ºC e 15 ºC, preferencialmente 10 ºC.

5- **USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DAS DISCINESIAS,** caracterizado por, na etapa 3, sua administração ser através de via subcutânea, em volume entre 35 e 45 µL, preferencialmente 40 µL, uma vez a cada 2 dias no período de 2 semanas.

6- **USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DAS DISCINESIAS,** de acordo com a reinvindicação 1, caracterizado por apresentar ação anti-inflamatória, neuroprotetora, terapêutica e antioxidante.

7- **USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DAS DISCINESIAS,** de acordo com a reinvindicação 1, caracterizado pela sua aplicação interagir com a via nigroestriatal dopaminérgica.

Figura 1

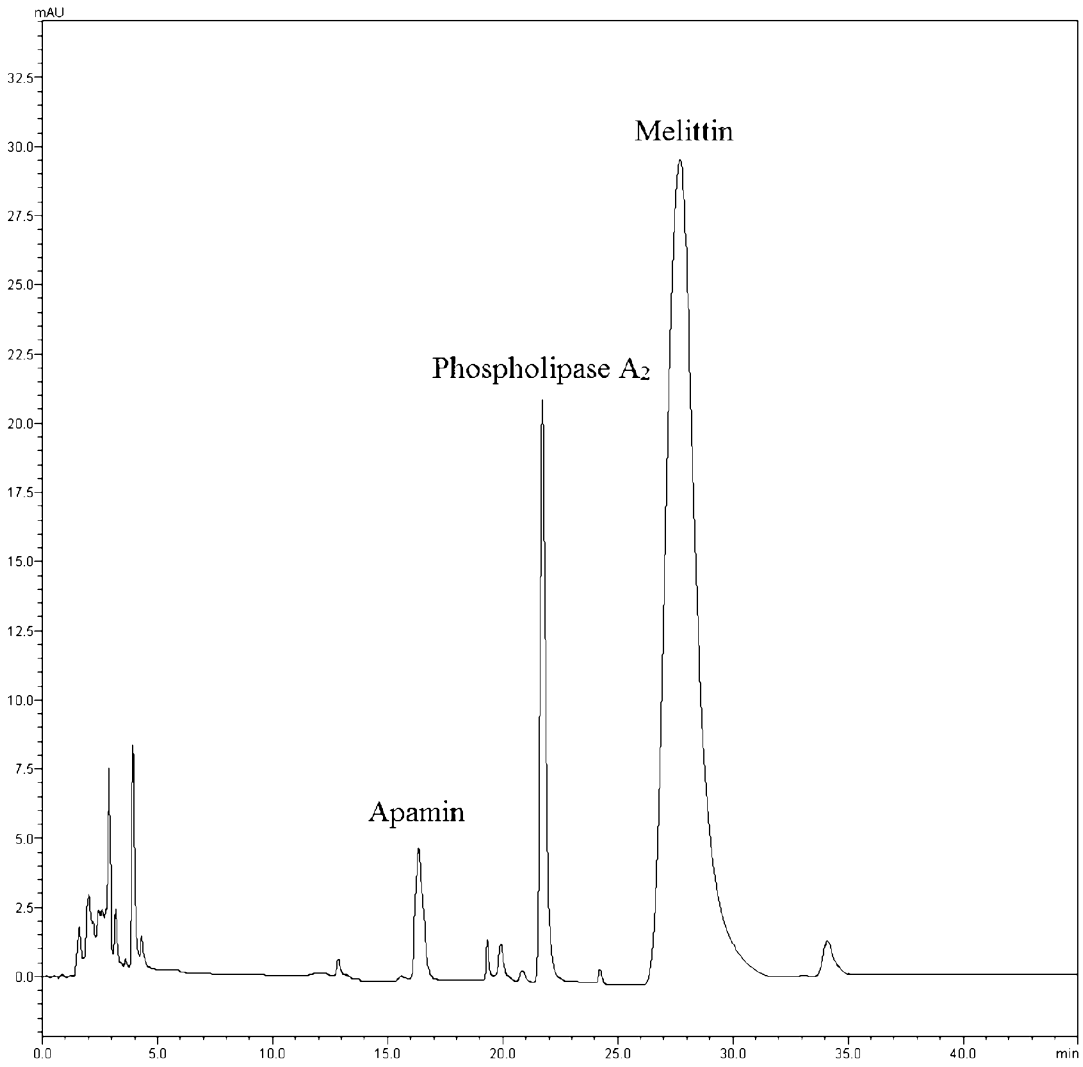


Figura 2

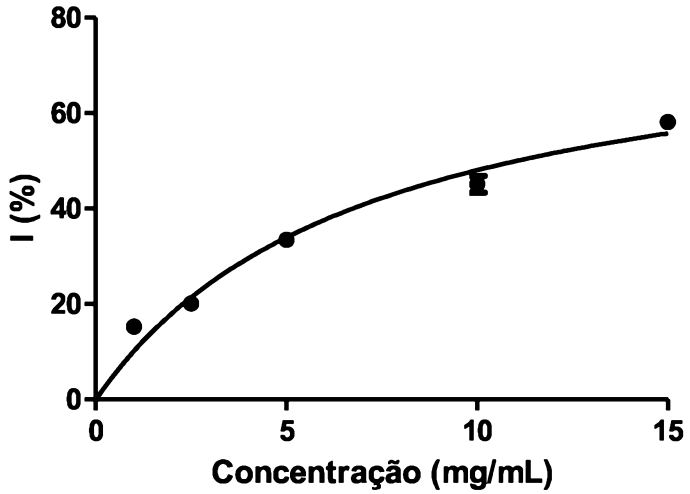


Figura 3

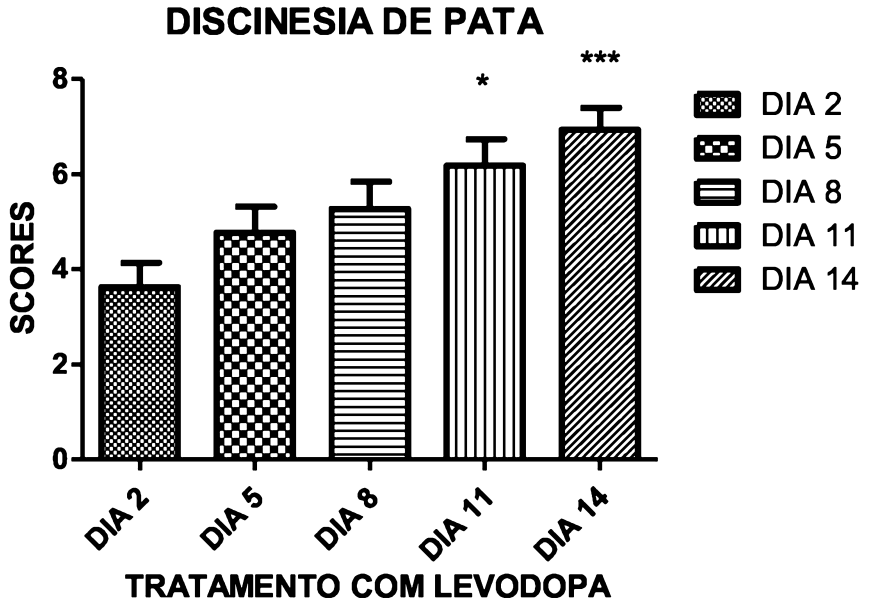


Figura 4

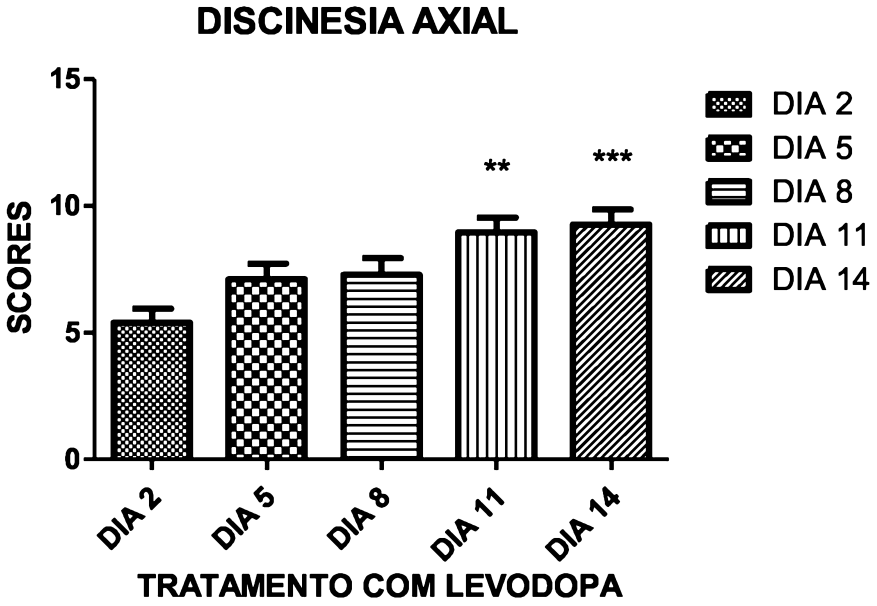


Figura 5

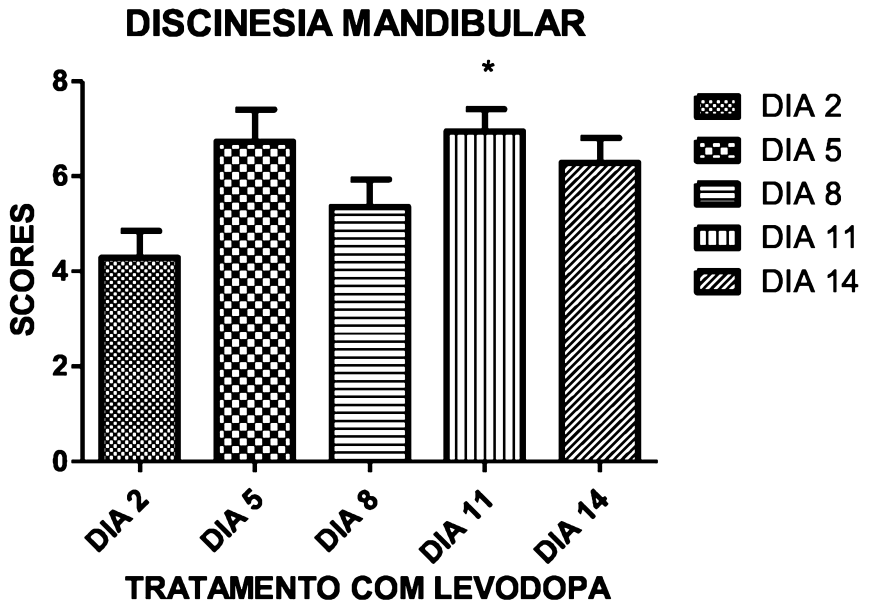


Figura 6

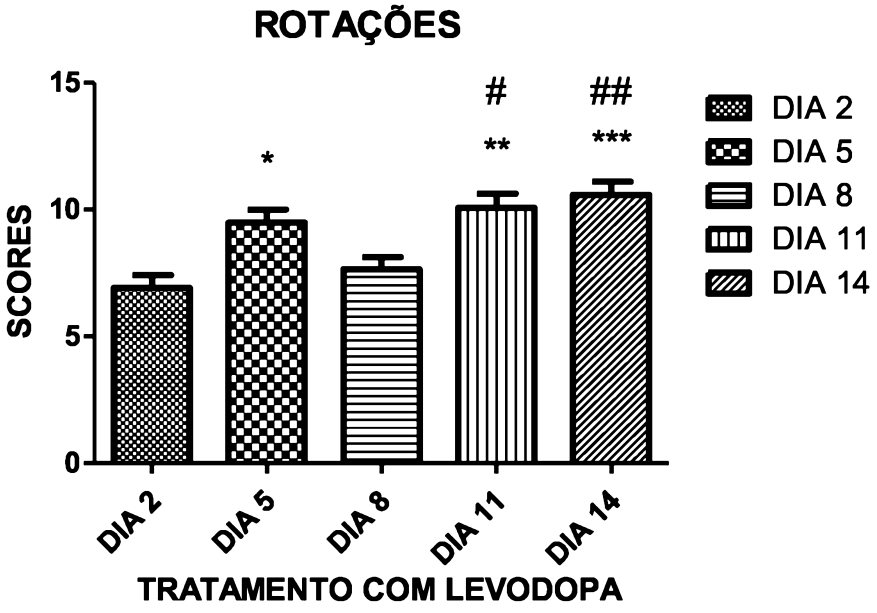


Figura 7

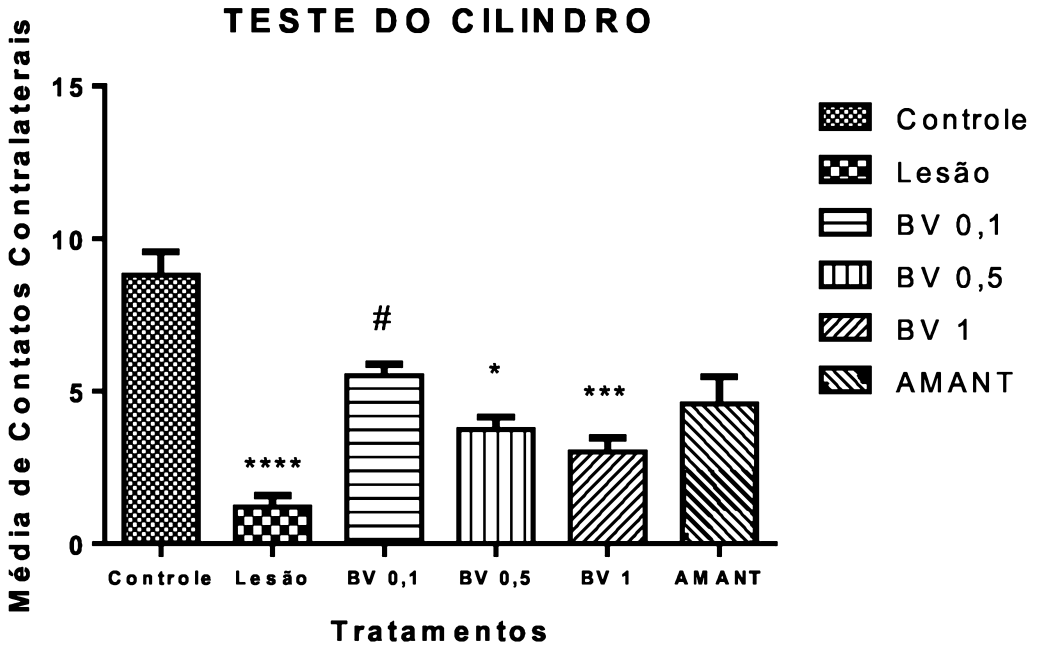


Figura 8

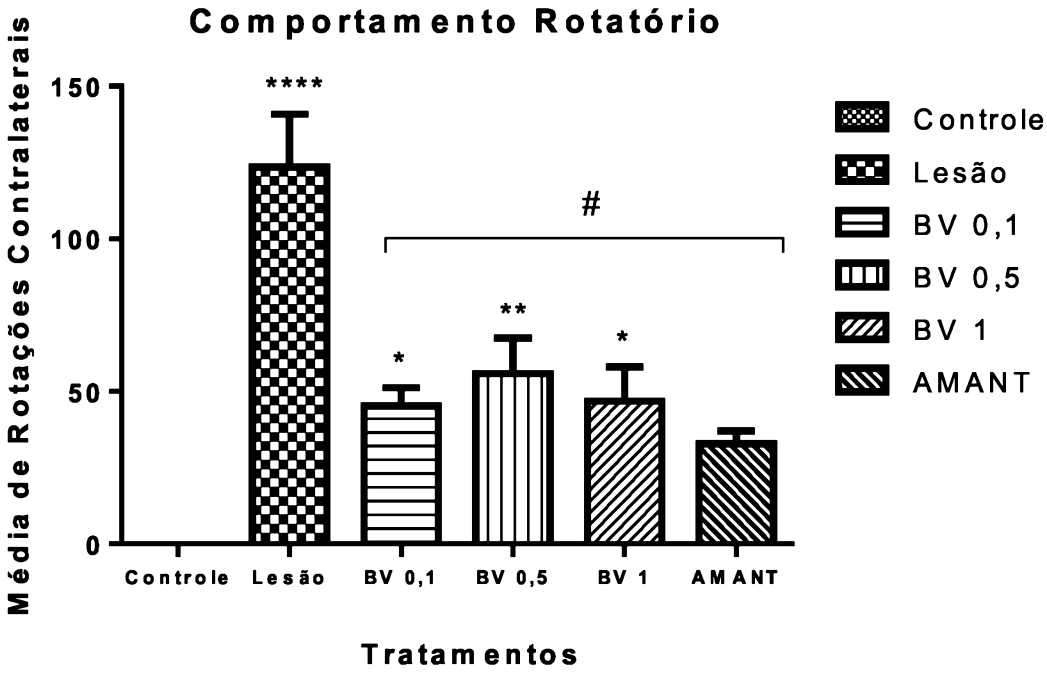
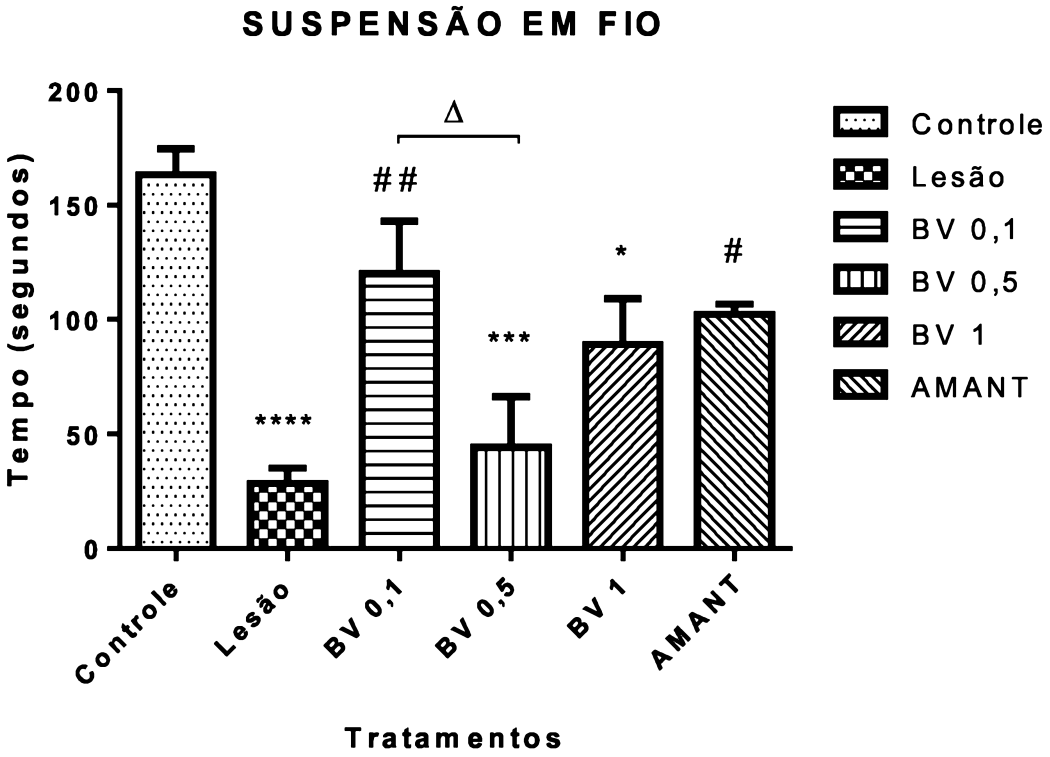


Figura 9


SUSPENSÃO EM FIO
Tempo (segundos)
200
150
100
50
0
Δ
##
****
***
*
#
Controle
Lesão
BV 0,1
BV 0,5
BV 1
AMANT
Tratamentos

RESUMO

USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DAS DISCINESIAS

A presente invenção se refere, preferencialmente, ao uso do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellifera Linnaeus*), com potente atividade anti-inflamatória, antioxidante, neuroprotetora e largo espectro de ação sobre o Sistema Nervoso Central, com ação terapêutica sobre as discinesias induzidas por levodopa, reduzindo a debilidade motora e restaurando a mobilidade funcional, com ação sobre o sistema dopaminérgico, a qual compreende os referidos compostos e um veículo farmaceuticamente aceitável.