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

(21) BR 102017025996-0 A2

(22) Data do Depósito: 01/12/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 25/06/2019

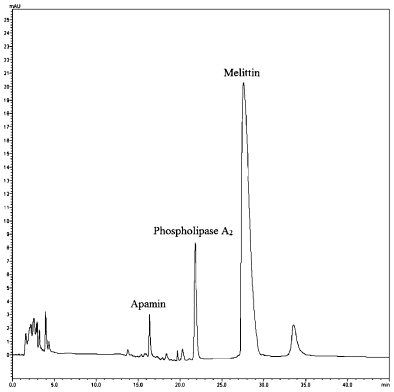
(54) Título: USO DO VENENO DE ABELHAS NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON E ESQUIZOFRENIA

(51) Int. Cl.: A61K 35/64; A61P 25/16; A61P 25/18.

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

(72) Inventor(es): MARGARETE ZANARDO GOMES; KÁTIA PERES GRAMACHO; LUIZ PEREIRA DA COSTA; FRANCINE FERREIRA PADILHA; CAMILA GOMES DANTAS; JULIANA CORDEIRO CARDOSO; RICARDO LUIZ CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE JÚNIOR.

(57) Resumo: USO DO VENENO DE ABELHAS NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON E ESQUIZOFRENIA A presente invenção se refere, preferencialmente, ao uso do veneno de abelhas africanizadas (Apis mellifera Linnaeus), com potente atividade anti-inflamatória, antioxidante e largo espectro de ação sobre o Sistema Nervoso Central, com ação terapêutica sobre a esquizofrenia e sobre a doença de Parkinson, com efeito antipsicótico e neuroprotetor, decorrentes da interação com o sistema dopaminérgico, a qual compreende os referidos compostos e um veículo farmaceuticamente aceitável



USO DO VENENO DE ABELHAS NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON E ESQUIZOFRENIA

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 e largo espectro de ação sobre o Sistema Nervoso Central, com ação terapêutica sobre a esquizofrenia e sobre a doença de Parkinson, com efeito antipsicótico e neuroprotetor, decorrentes da interação com o sistema dopaminérgico, a qual compreende os referidos compostos e um veículo farmaceuticamente aceitável.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

[002] A esquizofrenia e a doença de Parkinson são desordens com elevados índices epidemiológicos (CHEN et al., 2015; LIU et al., 2016; JANOUTOVÁ et al., 2016) e que afetam, sobremaneira, a qualidade de vida dos indivíduos acometidos e de seus familiares e/ou cuidadores (JANOUTOVÁ et al., 2016). A esquizofrenia é uma doença mental severa, cuja fisiopatogenia aponta para o acometimento de importantes vias dopaminérgicas, ocasionando sintomas como alucinações, delírios, apatia, comportamento antissocial e déficits em capacidades como atenção e memória (VAN ROOIJEN et al., 2017). Os tratamentos disponíveis consistem em antipsicóticos, contudo, estes causam efeitos colaterais neurológicos importantes (HARVEY et al., 2016).

[003] Adicionalmente, a doença de Parkinson (DP) configura-se como uma desordem neurodegenerativa progressiva e incapacitante (CHUNG et al., 2012), caracterizada pela perda contínua (maior que 80%) de neurônios dopaminérgicos na parte compacta da substância negra (SNc), implicando na redução de dopamina na via nigroestriatal (BALTAZAR et al., 2014). Os tratamentos farmacológicos disponíveis têm como objetivo restaurar a atividade dopaminérgica para melhorar a mobilidade funcional, aumentando a qualidade

de vida dos pacientes (HEISTERS, 2011). O principal medicamento utilizado como tentativa de repor a falta de dopamina é o 3,4-diidroxifenilalanina (Levodopa ou L-DOPA), contudo, os benefícios da farmacoterapia normalmente começam a declinar após cerca de cinco anos de uso contínuo e os efeitos colaterais incômodos se desenvolvem na forma de flutuações nas respostas motoras e discinesias, que atingem mais de 80% dos pacientes tratados, sendo considerado o conjunto mais debilitante de complicações motoras que surgem após longo período de uso da droga (DU; CHEN et al., 2017; SHUKLA, 2017).

[004] Neste sentido, o veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellifera L.*), também denominado apitoxina, constitui uma mistura de enzimas, peptídeos e aminoácidos com potente atividade sobre desordens neurológicas e largo espectro de ação (HWANG et al., 2015; MAURICE et al., 2015; YE et al., 2016). Algumas proteínas, em especial a melitina, equivalente a 50% de seu peso seco, têm sido relacionadas à transmissão dopaminérgica, juntamente com a apamina, outro peptídeo que atua como bloqueador de canais de K^+ ativados por Ca^{++} e que pode causar o aumento da atividade de neurônios dopaminérgicos (CHEN et al.,2014; LIU et al., 2010). Assim, a administração do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellifera L.*) pode representar uma nova alternativa de tratamento para a esquizofrenia e para a doença de Parkinson.

ESTADO DA TÉCNICA

[005] A literatura técnica especializada revela alguns documentos de patentes que fazem referência ao uso do veneno de abelhas para o tratamento da doença de Parkinson. 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 faça referência ao uso do

veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellifera L.*) para o tratamento da esquizofrenia e da doença de Parkinson.

[006] 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.

[007] O documento de anterioridade US20110059184 (A1), MEDICAMENT FOR TREATING PARKINSON'S DISEASE, descreve patente de invenção baseada na utilização de veneno de abelhas e apamina para aliviar os sintomas, restaurar e / ou proteger os neurônios de pacientes com doença de Parkinson.

[008] O produto proposto difere da patente supracitada no que se refere a origem do veneno de abelhas utilizado, visto que os inventores citam a utilização do veneno de abelhas domésticas européias e a presente proposta sugere a utilização de veneno proveniente de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*), que apresentam perfil químico diferenciado.

[009] O documento de anterioridade EP2173366 (B1), USE OF BEE VENOM FOR TREATING PARKINSON'S DISEASE, descreve a mesma patente de invenção descrita na base supracitada.

[0010] O documento de anterioridade FR2918281, USE OF BEE VENOM, FOR PREPARING A SINGLE DOSE UNIT FOR SUBCUTANEOUS INJECTION FOR ONE TO SIX WEEKS, AND A DRUG FOR RELIEVE SYMPTOMS AND/OR RESTORE AND/OR PROTECT THE NEURONS OF PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE, descreve a mesma patente de invenção inicialmente citada.

[0011] Os documentos de anterioridade PT2173366 (E) e FR2918281 (A1) encontradas na base *WorldWide* também descrevem a patente de invenção inicialmente citada. O mesmo ocorre com as patentes publicadas como: DK2173366 (T3); EP2173366 (A2); ES2421709 (T3); JP2010531861 (A); JP5517925 (B2); US8232249 (B2); WO2009022067 (A2); WO2009022067

(A3); WO2009022067 (A8); US8232249 (B2); WO2009022067 (A2); WO2009022067 (A3); WO2009022067 (A8); US8232249 (B2); WO2009022067 (A2); WO2009022067 (A3); WO2009022067 (A8); WO2009022067 (A8) e WO2009022067 (A8).

[0012] Assim, e a partir dos documentos revelados, ressalta-se que o desenvolvimento do **'UTILIZAÇÃO DO VENENO DE ABELHAS AFRICANIZADAS PARA O TRATAMENTO DA ESQUIZOFRENIA E DOENÇA DE PARKINSON'** 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.

[0013] 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

[0014] A presente invenção refere-se à utilização do veneno extraído de abelhas africanizadas (*Apis mellifera L.)*. O produto apresenta potente atividade anti-inflamatória, antioxidante e largo espectro de ação sobre o Sistema Nervoso Central, com ação terapêutica sobre a esquizofrenia e sobre a doença de Parkinson, com efeitos antipsicótico e neuroprotetor, decorrentes da interação com o sistema dopaminérgico.

[0015] A aplicação do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*) sobre a esquizofrenia reduziu os sintomas positivos e negativos observados no modelo experimental, com mecanismo de ação decorrente da interação com os sistemas glutamatérgico e dopaminérgico, de maneira distinta a dos neurolépticos típicos, que apresentam maior incidência de efeitos adversos. A aplicação do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*) sobre a doença de Parkinson forneceu neuroproteção em modelo animal da doença,

com aumento significativo do controle motor e da sobrevivência de neurônios dopaminérgicos remanescentes após lesão.

[0016] A invenção proposta busca o preenchimento de uma lacuna farmacêutica e tecnológica, em termos da aplicação do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*) como elemento ativo de composições farmacêuticas, além de propor melhorar a biodisponibilidade deste produto, promovendo ação terapêutica inédita para tratamento da esquizofrenia e da doença de Parkinson, devido às suas interações o sistema dopaminérgico.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0017] A **figura 1** anexa apresenta o cromatograma de HPLC (λ= 280 nm) do veneno de abelhas (BV) africanizadas (*Apis mellífera L.*) proveniente do estado de São Paulo/ Brasil.

[0018] A **figura 2** anexa apresenta resultados do teste de hiperlocomoção induzida por MK-801. As colunas representam as médias de explorações horizontais (quadrantes percorridos) e as barras o erro padrão da média. No eixo das abscissas estão indicados, respectivamente, os tratamentos administrados quarenta e dez minutos antes dos testes. Api01 e Api1: apitoxina a 0,1 e 1,0 $mg.kg^{-1}$, respectivamente; MK: MK-801. * indica diferença significativa em relação ao grupo Salina/Salina, ** indica diferença em relação aos grupos Api1/Salina e Haloperidol/Salina, *** indica diferença em relação a todos os grupos controle (administração prévia de salina), # indica diferença significativa em relação ao grupo Salina/MK.

[0019] A **figura 3** anexa apresenta resultados do teste de nado forçado. As colunas representam o tempo médio de imobilidade e as barras o erro padrão da média. No eixo das abscissas estão indicados, respectivamente, os tratamentos administrados quarenta e dez minutos antes dos testes. Api01 e Api1: apitoxina a 0,1 e 1,0 $mg.kg^{-1}$, respectivamente; MK: MK-801. * indica diferença significativa em relação ao grupo Salina/Salina, # indica diferença significativa em relação ao grupo Salina/MK, ## indica diferença significativa em relação a todos os demais grupos.

[0020] A **figura 4** anexa apresenta o resultado do parâmetro de exploração horizontal (EH) no teste de campo aberto. As colunas representam as médias de explorações horizontais nos grupos e as barras representam o erro padrão da média. Símbolos diferentes indicam diferenças significativas: * ($p < 0,05$) e # ($p = 0,001$). ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey.

[0021] A **figura 5** anexa apresenta o resultado do parâmetro de exploração vertical (EV) no teste de campo aberto. As colunas representam as médias de explorações horizontais nos grupos e as barras representam o erro padrão da média. Símbolos diferentes indicam diferenças significativas: * ($p < 0,05$) e # ($p = 0,001$). ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey.

[0022] A **figura 6** anexa apresenta fotomicrografias representativas do tecido encefálico, na região da SNc, após imunohistoquímica para TH. As imagens (B), (D), (F), (H), (J) representam os lados lesionados e as imagens (A), (C), (E), (G), (I) representam seus respectivos controles. Em (A) e (B): grupo Salina/Salina, (C) e (D) 6-OHDA/Salina, (E) e (F) 6-OHDA/apitoxina 0,01 $mg.Kg^{-1}$, (G) e (H) 6-OHDA/apitoxina 0,05 $mg.Kg^{-1}$, (I) e (J) 6-OHDA/apitoxina $mg.Kg^{-1}$, referindo-se respectivamente a microinjeção intraestriatal e ao tratamento sistêmico. Aumento de 100X

[0023] A **figura 7** anexa apresenta fotomicrografias representativas do tecido encefálico, na região da CPU, após imunohistoquímica para TH. As imagens (A), (C), (E), (G) representam os lados lesionados e as imagens (B), (D), (F), (H) representam seus respectivos controles. Em (A) e (B): grupo 6-OHDA/ Salina, (C) e (D): 6-OHDA/apitoxina 0,01 $mg.Kg^{-1}$, (E) e (F): 6-OHDA/apitoxina 0,05 $mg.Kg^{-1}$ e (G) e (H): 6-OHDA/apitoxina 0,1 $mg.Kg^{-1}$, referindo-se respectivamente a microinjeção intraestriatal e ao tratamento sistêmico. Aumento de 40X.

[0024] A **figura 8** anexa apresenta o efeito do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*) -BV- na degeneração neuronal dopaminérgica induzida por 6-OHDA em camundongos. Histograma representa sobrevivência de células dopaminérgicas na substância negra compacta. BV induziu aumento significativo na sobrevivência de neurônios dopaminérgicos a partir de 0,1

mg.Kg^{-1}. Letras diferentes indicam diferenças significativas. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey.

[0025] A **figura 9** anexa apresenta o efeito do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*) -BV- na degeneração neuronal dopaminérgica induzida por 6-OHDA em camundongos. Histograma representa sobrevivência de células dopaminérgicas no estriado. O BV induziu aumento significativo na sobrevivência de neurônios dopaminérgicos a partir de 0,01 mg.Kg^{-1}. Letras diferentes indicam diferenças significativas. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey.

[0026] A **figura 10** anexa apresenta fotomicrografias representativas do tecido encefálico, na região do estriado, após imunohistoquímica para Proteína Glial Fibrilar Ácida – GFAP –. Em (A) grupo 6-OHDA/ Salina, (B) Salina/ Salina; (C) 6-OHDA/ BV0,01 mg.Kg^{-1}, (D) 6-OHDA/BV 0,05 mg.Kg^{-1}, (E) 6-OHDA/BV 0,1 mg.Kg^{-1}, referindo-se a microinjeção intraestriatal e ao tratamento sistêmico. Aumento de 40X.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0027] Nesta seção serão revelados todos os detalhes sobre a **'UTILIZAÇÃO DO VENENO DE ABELHAS AFRICANIZADAS PARA O TRATAMENTO DA ESQUIZOFRENIA E DOENÇA DE PARKINSON'**, 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 e largo espectro de ação sobre o Sistema Nervoso Central, com ação terapêutica sobre a esquizofrenia e sobre a doença de Parkinson, com efeitos antipsicótico e neuroprotetor, decorrentes da interação com o sistema dopaminérgico.

[0028] É importante destacar que o veneno de abelhas tem qualidades que permitem selecioná-lo para utilização do mesmo com elevado potencial terapêutico e atividade anti-inflamatória.

[0029] A aplicação do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*) sobre a esquizofrenia reduziu os sintomas positivos e negativos observados no modelo experimental, com mecanismo de ação decorrente da interação com os sistemas glutamatérgico e dopaminérgico, de maneira distinta a dos neurolépticos típicos, que apresentam maior incidência de efeitos adversos. A aplicação do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*) sobre a doença de Parkinson forneceu neuroproteção em modelo animal da doença, com aumento significativo do controle motor e da sobrevivência de neurônios dopaminérgicos remanescentes após lesão. Desta forma, esta invenção consiste numa terapêutica medicamentosa inédita.

[0030] O invento proposto oferece redução significativa dos sintomas esquizofrênicos testados. A dose de administração é na faixa de 0,1 a 1 $mg.Kg^{-1}$, preferencialmente de 1 $mg.Kg^{-1}$. Ademais, o invento proposto oferece aumento significativo do controle motor e da sobrevivência de neurônios dopaminérgicos remanescentes após lesão para doença de Parkinson. A dose de administração é na faixa de 0,01 a 0,1 $mg.Kg^{-1}$, preferencialmente de 0,1 $mg.Kg^{-1}$.

[0031] O veneno de abelhas foi comprado de um apiário na cidade de São Roque/ São Paulo, na região Sudeste 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).

[0032] Para indução do modelo experimental de esquizofrenia foram utilizados os seguintes produtos químicos comerciais: Maleato de dizolcipina -MK 801- (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil), Decanoato de Haloperidol (Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda, Brasil). Para análise cromatográfica e espectrofotométrica

foram utilizados: apamina, melitina e fosfolipase A_2 (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil. Para indução do modelo experimental de doença de Parkinson foram utilizados os seguintes produtos químicos comerciais: 6-hidroxidopamina (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil), hidrocloreto de Apomorfina (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil), Soro Albumina-Bovina (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil), Avidina-Biotina-Peroxidase (Kit ABC, Vectastain, Vector Laboratories®), Tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil), anticorpo anti-tirosina hidroxilase – TH – (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil), anticorpo anti-proteína glial fibrilar ácida – GFAP – (ABCAM®, São Paulo, Brasil).

[0033] O processo para utilização do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellifera L.*) consistiu nas seguintes etapas.

ETAPA 1: OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO

[0034] O veneno de abelhas foi comprado sob a forma de pó, de um apiário na cidade São Roque – São Paulo, na região Sudeste 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).

[0035] O produto foi armazenado em frasco âmbar e sob refrigeração (na faixa entre 5 ºC e 15 ºC, preferencialmente10 ºC).

ETAPA 2: DISSOLUÇÃO

[0036] 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 (na faixa entre 5 ºC e 15 ºC, preferencialmente 10 ºC).

ETAPA 3: APLICAÇÃO

[0037] Para o experimento de esquizofrenia, o veneno foi administrado via subcutânea (s.c.), em volume entre 35 e 45 µL, preferencialmente 40 µL, durante 2 semanas.

[0038] Para o experimento de doença de Parkinson, 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 3 semanas.

Análise por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

[0039] 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).

[0040] 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).

[0041] 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.

[0042] 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.

Ensaio biológico

Animais e instruções éticas

[0043] Em ambos experimentos foram utilizados camundongos albinos suíços do sexo masculino (25-30 g), 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 os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tiradentes, Aracaju- SE, Brasil (Experimento

Esquizofrenia: Aprovação sob o número 011013; Experimento Parkinson: Aprovação sob o número 010514R).

Indução do modelo experimental da esquizofrenia

[0044] Os animais receberam MK-801 (dose na faixa entre 0,1 e 0,5 $mg.Kg^{-1}$, preferencialmente 0,3 $mg.Kg^{-1}$, via i.p.) ou salina (volume na faixa entre 0,5 e 1 $mL.Kg^{-1}$, preferencialmente 1 $mL.Kg^{-1}$) por 5 dias consecutivos (OZDEMIR et al., 2012).

Indução da morte neuronal dopaminérgica por 6-hidroxidopamina (6-OHDA)

[0045] 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.

[0046] Para o modelo de morte de neurônios dopaminérgicos, os parâmetros utilizados (lado direito) para microinjeção de 6-OHDA foram obtidos de acordo com Heuer et al. (2012) e Francardo et al. (2011), nas seguintes coordenadas (em mm em relação ao bregma, sutura sagital e da superfície dural): duas injeções de 1,5 µl em cada sítio (i) AP= + 1,0; L= − 2,1; DV= − 2,9 e (ii) AP= + 0,3; L= − 2,3; DV= − 2,9.

[0047] Foram injetados 6 $\mu g.\mu L^{-1}$ de uma solução de 6-OHDA ou de solução salina contendo 0,02% de ácido ascórbico (HEUER et al., 2012), utilizando uma micro seringa Hamilton 705 (50 µL) acoplada ao aparelho estereotáxico e a bomba de infusão BI-2008. As injeções foram realizadas a uma taxa de 1 µl/min. Controles receberam solução de 0,9% de salina estéril contendo 0,02 $mg.mL^{-1}$ de ácido ascórbico.

[0048] 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.

Tratamento com veneno de abelhas, amantadina ou salina

[0049] Após a indução do modelo experimental de esquizofrenia, os animais receberam haloperidol (dose na faixa entre 0,5 e 1 $mg.kg^{-1}$, preferencialmente 1 $mg.Kg^{-1}$; via i.p.), veneno de abelhas africanizadas -*Apis mellífera L.*- (dose na faixa entre 0,1 e 1 $mg.Kg^{-1}$; preferencialmente 0,1 ou 1 $mg.Kg^{-1}$, via s.c.) ou salina (0,9%, volume entre 35 e 45 µL, preferencialmente 40 µl; via s.c.), de acordo com o grupo a que pertenciam, durante 2 semanas. No 19° dia, após a última aplicação de haloperidol, veneno ou salina, os roedores foram submetidos aos testes de hiperlocomoção induzida por MK-801 e nado forçado, para verificação de possível efeito antipsicótico das substâncias testadas (OZDEMIR et al., 2012).

[0050] Após a indução da doença de Parkinson, os animais receberam veneno de abelhas africanizadas -*Apis mellífera L.*- (dose na faixa entre 0,01 e 0,1 $mg.Kg^{-1}$, preferencialmente 0,01; 0,05 ou 0,1 $mg.Kg^{-1}$, via s.c. (DOO et al., 2010; KHALIL et al., 2014; CAI et al., 2015) ou salina (volume entre 35 e 45 µL, preferencialmente 40 µl), via s.c. (KIM et al., 2011), de acordo com os grupos a que pertenciam. O tratamento foi realizado 1 vez a cada 2 dias, por 3 semanas (DOO et al., 2010; YANG et al., 2010; KHALIL et al., 2014; CAI et al., 2015). Os efeitos funcionais foram caracterizados por meio do teste comportamental de campo aberto. A morte neuronal dopaminérgica e a expressão astrocitária foram avaliados por meio de reações imunohistoquímicas.

Testes comportamentais

[0051] No modelo experimental de esquizofrenia, foram realizados os seguintes testes comportamentais: Teste de hiperlocomoção induzida por MK-801 (por meio do campo aberto) e nado forçado (OZDEMIR et al., 2012).

[0052] No modelo experimental de doença de Parkinson, foi realizado o teste de campo aberto (FRANCARDO et al., 2011; HEUER et al., 2012).

[0053] **Teste do campo aberto para avaliação da hiperlocomoção induzida por MK-801**: Inicialmente descrito por Walsh; Cummins, 1975, o teste de campo aberto consiste na mensuração de comportamentos expressados ao se colocar um animal em espaço aberto novo, de onde a fuga do mesmo é evitada pelas paredes que o circundam. Este teste pode ser utilizado para avaliação da atividade motora e do estado emocional dos animais (WHIMBEY; DENENBERG, 1967). O parâmetro avaliado foi a frequência dos comportamentos de exploração horizontal (número de quadrantes percorridos pelo animal com as quatro patas). O equipamento consiste numa área cilíndrica de 72 cm de diâmetro, com paredes de acrílico translúcido de 49 cm de altura, disposta sobre uma base de madeira recoberta de fórmica de cor branca, subdividida em quatro quadrantes de 339,3 cm^2 cada. Cada animal foi avaliado individualmente durante 5 minutos. Entre o teste de um animal e outro, o equipamento foi limpa com álcool 20% para evitar a influência do cheiro de outros animais.

[0054] **Teste de nado forçado**: O teste do nado forçado é um dos modelos mais tradicionais para o estudo da depressão em animais de laboratório, por apresentar alto valor preditivo devido à resposta aos medicamentos antidepressivos existentes. Proposto por Porsolt et al. (1977), roedores são expostos a uma situação aversiva, nadar em um tanque cilíndrico com água, onde eles não podem tocar o fundo do cilindro ou fugir (escape). Com o tempo os animais percebem que não tem como sair do local e desenvolvem uma postura de imobilidade. O teste é filmado e avaliam-se os períodos de imobilidade e natação.

Eutanásia e Procedimentos histológicos

[0055] Nos dois modelos experimentais os animais foram submetidos à eutanásia após os testes comportamentais, 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

[0056] 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.

[0057] 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	6,78 ± 0,06
Melitina	137,47 ± 0,13
Phospholipase A_2	30,63 ± 0,15

[0058] No teste de hiperlocomoção induzido por MK-801, realizado no modelo experimental de esquizofrenia, observou-se ação esperada do antagonista de receptores glutamatérgicos NMDA (MK-801), que induziu aumento na média de explorações horizontais em relação ao todos os grupos controle (salina). Este efeito foi revertido por ambas as doses de apitoxina e também pelo haloperidol (Figura 2).

[0059] O MK-801 induziu aumento no tempo de imobilidade no teste de nado forçado. A apitoxina na dose de 1 $mg.Kg^{-1}$ reverteu este efeito enquanto o haloperidol o elevou (Figura 3).

[0060] No teste de campo aberto realizado no modelo de doença de Parkinson, no que se refere ao parâmetro motor de exploração horizontal, observa-se que

o grupo 6-OHDA/salina apresentou redução significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo salina/salina. Em contrapartida, o grupo 6-OHDA/apitoxina (0,1 $mg.Kg^{-1}$) aumentou significativamente as explorações horizontais em relação ao grupo 6-OHDA/salina ($p = 0,001$). Estes dados podem ser observados na Figura 4 (ANOVA, $F_{4-42}= 4,311$).

[0061] No que se refere ao parâmetro motor de explorações verticais, observa-se que apenas o grupo 6-OHDA/salina apresentou diminuição significativa em relação ao grupo controle (salina/salina; $p = 0,03$) e o grupo 6-OHDA/apitoxina (0,1 $mg.Kg^{-1}$) apresentou aumento significativo das explorações verticais em relação ao grupo 6-OHDA/salina ($p = 0,001$), conforme Figura 5 (ANOVA, $F_{4-59} =4,192$).

[0062] A análise qualitativa da expressão de Tirosina hidroxilase (TH) permite inferir que os encéfalos dos animais que receberam 6-OHDA/salina, referindo-se respectivamente a microinjeção intraestriatal e ao tratamento sistêmico, apresentaram redução no número de neurônios positivos na Substância Negra compacta (SNc). Mediante associação ao tratamento com apitoxina 0,1 $mg.Kg^{-1}$, observa-se aumento na quantidade de células marcadas na SNc, com aspecto similar ao controle do lado oposto (Figura 6).

[0063] A análise qualitativa da expressão de TH demonstra grande perda de terminais dopaminérgicos na região dorso lateral do estriado (CPU) dos animais que receberam 6-OHDA/salina. Em contrapartida, mediante associação ao tratamento com apitoxina 0,01 $mg.Kg^{-1}$, observa-se preservação da quantidade de terminais imunorreativos, com aspecto similar ao controle do lado oposto. O tratamento com apitoxina na concentração 0,1 $mg.Kg^{-1}$ revela pequena perda de terminais dopaminérgicos na região dorso-lateral superior da CPU (Figura 7).

[0064] A quantificação de expressão da TH consistiu na contagem dos neurônios imunorreativos a este marcador dopaminérgico na Substância Negra compacta (SNc) e no estriado (CPU). Quando analisada a região da SNc, observa-se redução significativa de neurônios dopaminérgicos no grupo lesão ($p<0,0001$) e aumento significativo de sobrevivência neuronal nos animais que

receberam veneno de abelhas a partir de 0,1 mg.Kg^{-1} ($p<0,0001$), conforme Figura 8 (ANOVA, $F_{4-70}= 7,794$; $p<0,0001$).

[0065] Observa-se que animais do grupo 6-OHDA/ salina apresentaram perda de neurônios dopaminérgicos na CPU verificada pela diminuição da imunorreatividade para TH nessa região em comparação com o lado contralateral a lesão ($p = 0,001$). Em contrapartida, animais que receberam veneno de abelhas em diferentes doses, a partir de 0,01 mg.Kg^{-1}, apresentaram aumento significativo de sobrevivência de neurônios dopaminérgicos ($p=0,001$), Figura 9 (ANOVA, $F_{4-33}= 5,719$; $p=0,001$).

[0066] A análise qualitativa da expressão de GFAP permitiu inferir que os encéfalos dos animais que receberam 6-OHDA/salina, apresentaram infiltrado astrocitário na CPU, diferente do aspecto dos grupos tratados com o veneno, que se mostraram similares ao controle figura 10.

[0067] Desta forma, conclui-se que a administração do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*), com dose na faixa entre 0,1 a 1 mg.Kg^{-1}, preferencialmente de 1 mg.Kg^{-1}, reduziu os sintomas positivos e negativos na esquizofrenia experimental. O mecanismo de ação possivelmente interfere com receptores glutamatérgicos e dopaminérgicos. Esta ação parece ser distinta á dos neurolépticos típicos, os quais apresentam maior incidência de efeitos adversos.

[0068] Também, conclui-se que o tratamento com veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellifera L.*), com dose na faixa entre 0,01 a 0,1 mg.Kg^{-1}, preferencialmente de 0,1 mg.Kg^{-1}, teve efeito neuroprotetor sobre o modelo de Parkinson, tendo reduzido reação glial e a morte neuronal dopaminérgica induzida por 6-OHDA em roedores.

REIVINDICAÇÕES

1- **USO DO VENENO DE ABELHAS NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON E ESQUIZOFRENIA,** caracterizado pelo tratamento ser utilizado de maneira isolada, em doses entre 0,1 a 1 mg.Kg-1 para tratamento da esquizofrenia e 0,01 a 0,1 mg.Kg-1 para tratamento da doença de Parkinson.

2- **USO DO VENENO DE ABELHAS NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON E ESQUIZOFRENIA,** caracterizado por a espécie da abelha africanizada ser identificada como *Apis mellifera Linnaeus.*

3- **USO DO VENENO DE ABELHAS NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON E ESQUIZOFRENIA**, 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 NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON E ESQUIZOFRENIA,** de acordo com a reinvindicação 1, caracterizado por apresentar ação anti-inflamatória, antioxidante e terapêutica.

6- **USO DO VENENO DE ABELHAS NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON E ESQUIZOFRENIA,** de acordo com a reinvindicação 1, caracterizado por sua aplicação interagir com o sistema dopaminérgico e glutamatérgico.

7- **USO DO VENENO DE ABELHAS NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON E ESQUIZOFRENIA,** de acordo com a reinvindicação 1, caracterizado por, na etapa 3, o tratamento para esquizofrenia ser

administrado em dose na faixa de 0,1 a 1 $mg.Kg^{-1}$, preferencialmente de 1 $mg.Kg^{-1}$, por via subcutânea, diariamente, no período de 2 semanas.

8- **USO DO VENENO DE ABELHAS NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON E ESQUIZOFRENIA,** de acordo com a reinvindicação 1, caracterizado por, na etapa 3, o tratamento para doença de Parkinson ser administrado em dose na faixa de 0,01 a 0,1 $mg.Kg^{-1}$, preferencialmente de 0,1 $mg.Kg^{-1}$, por via subcutânea, uma vez a cada dois dias, no período de 3 semanas.

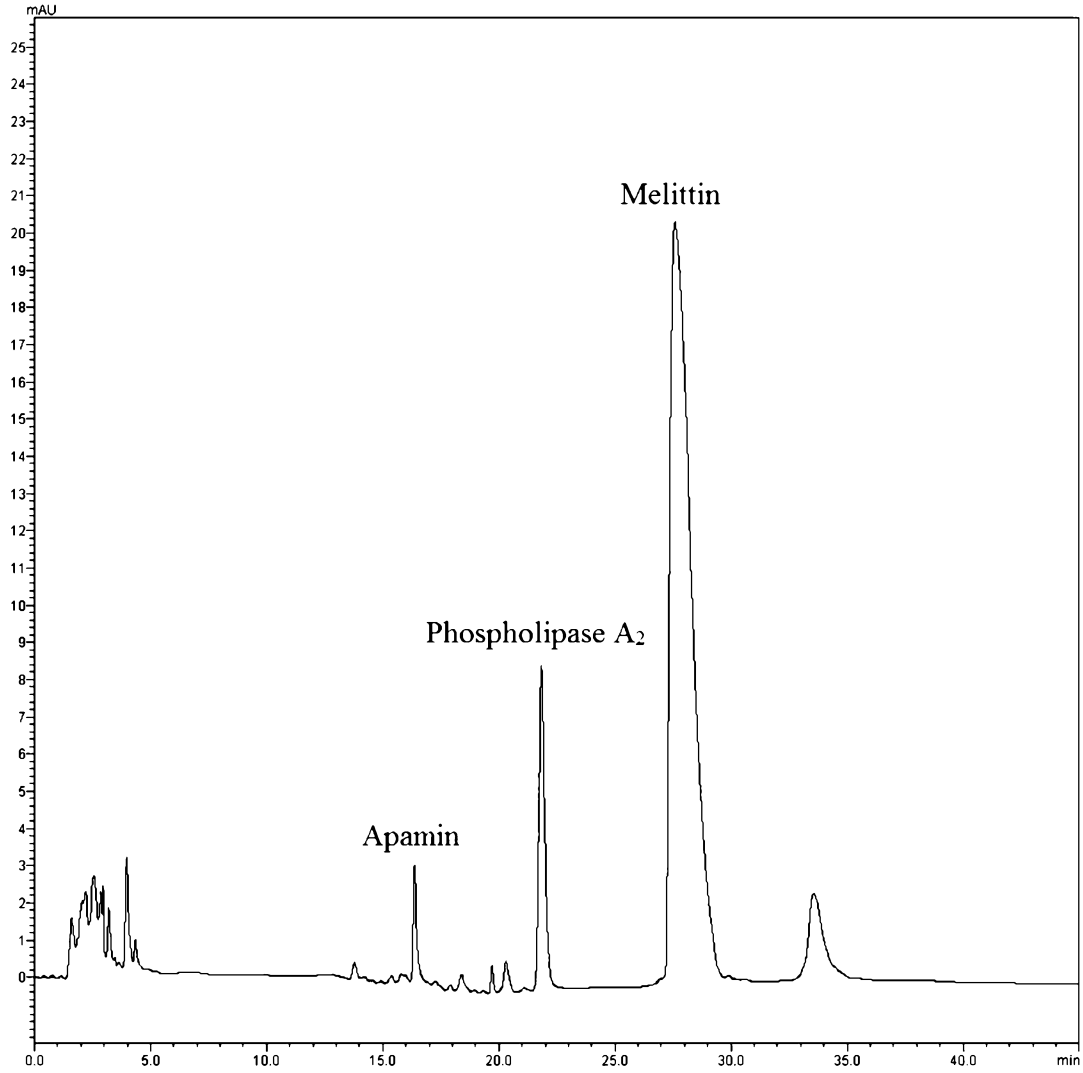


Figura 1

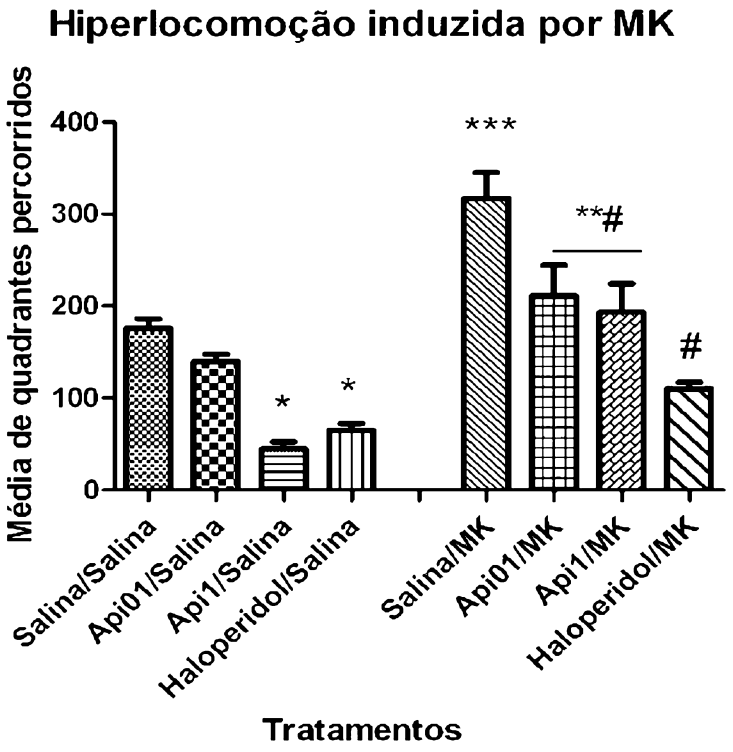


Figura 2

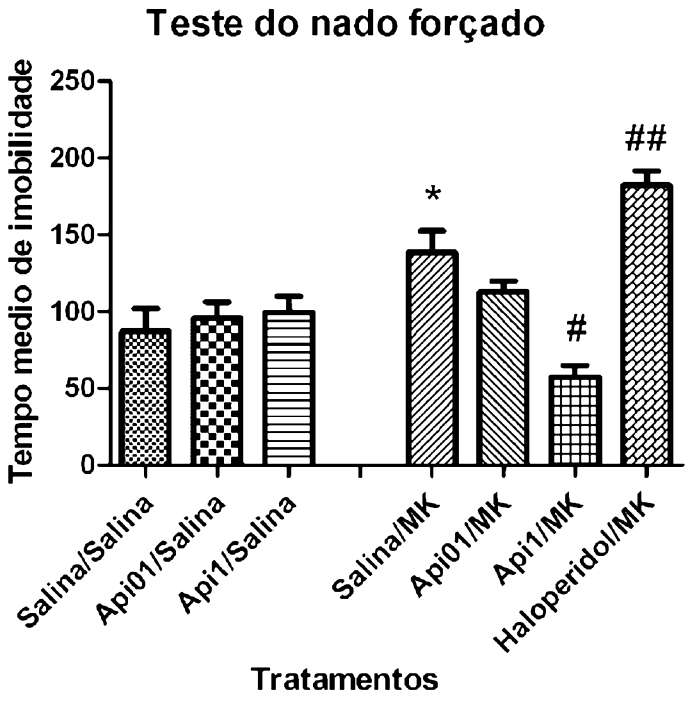


Figura 3

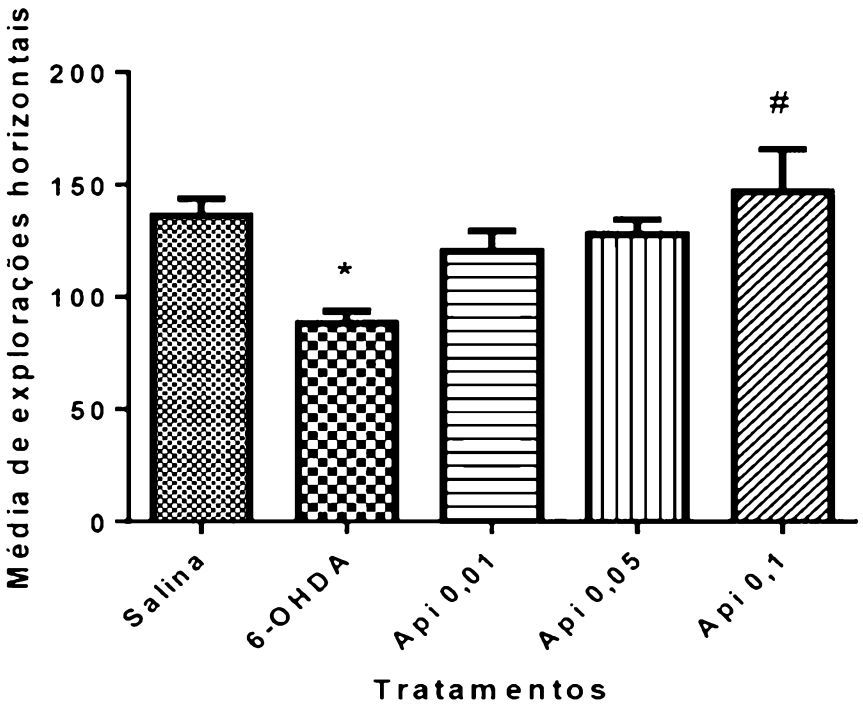


Figura 4

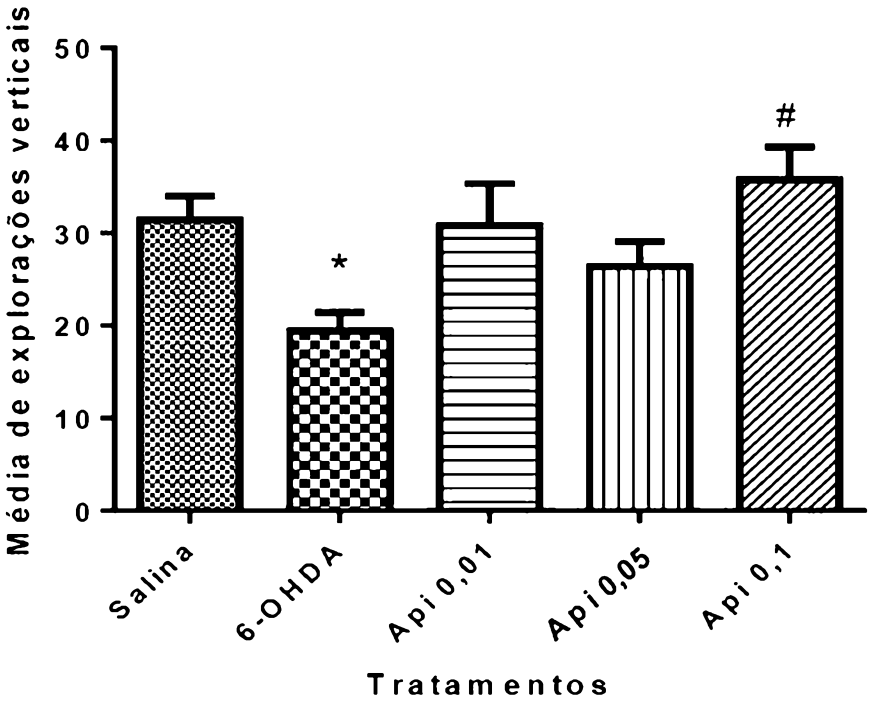


Figura 5

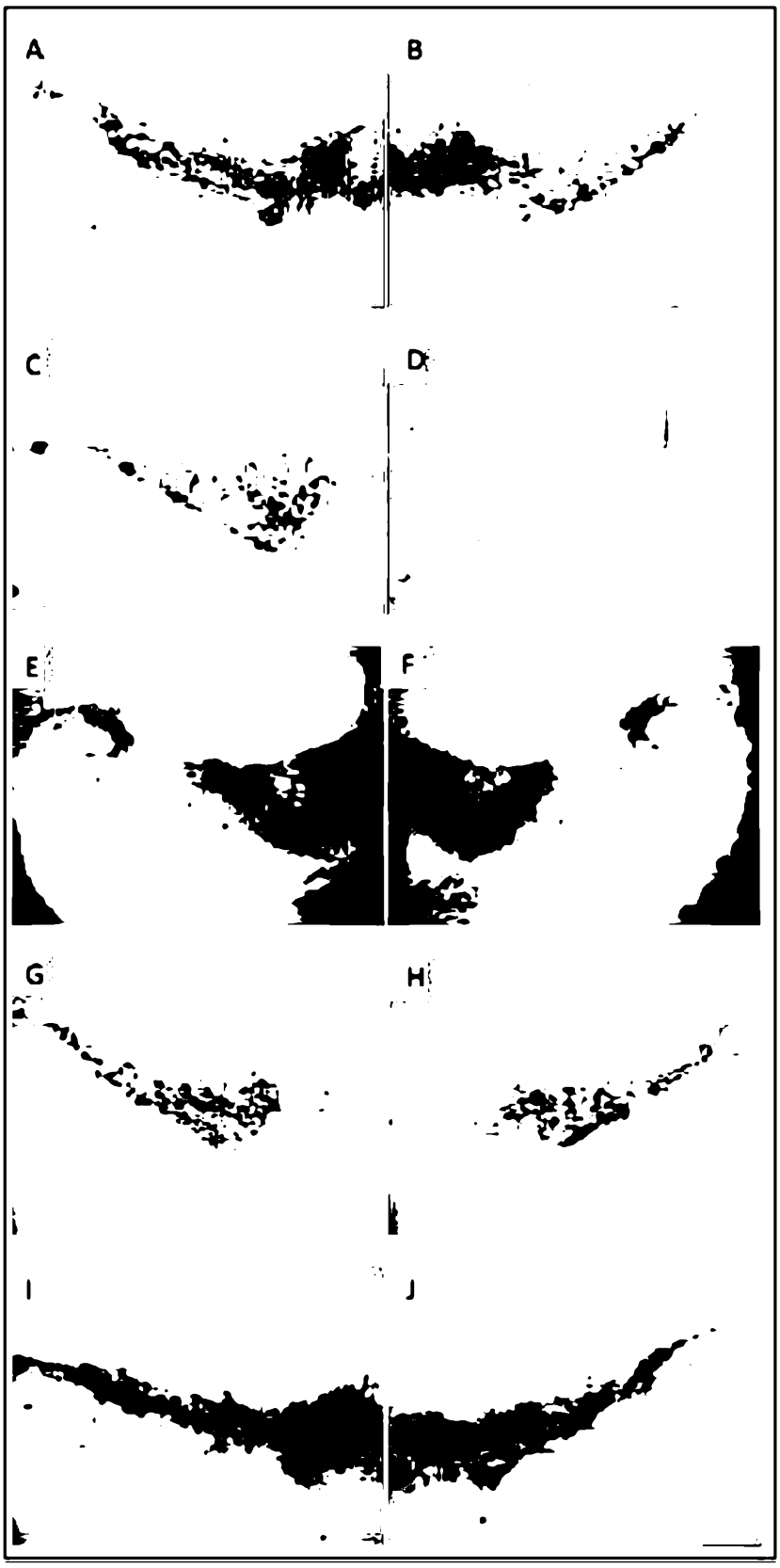


Figura 6

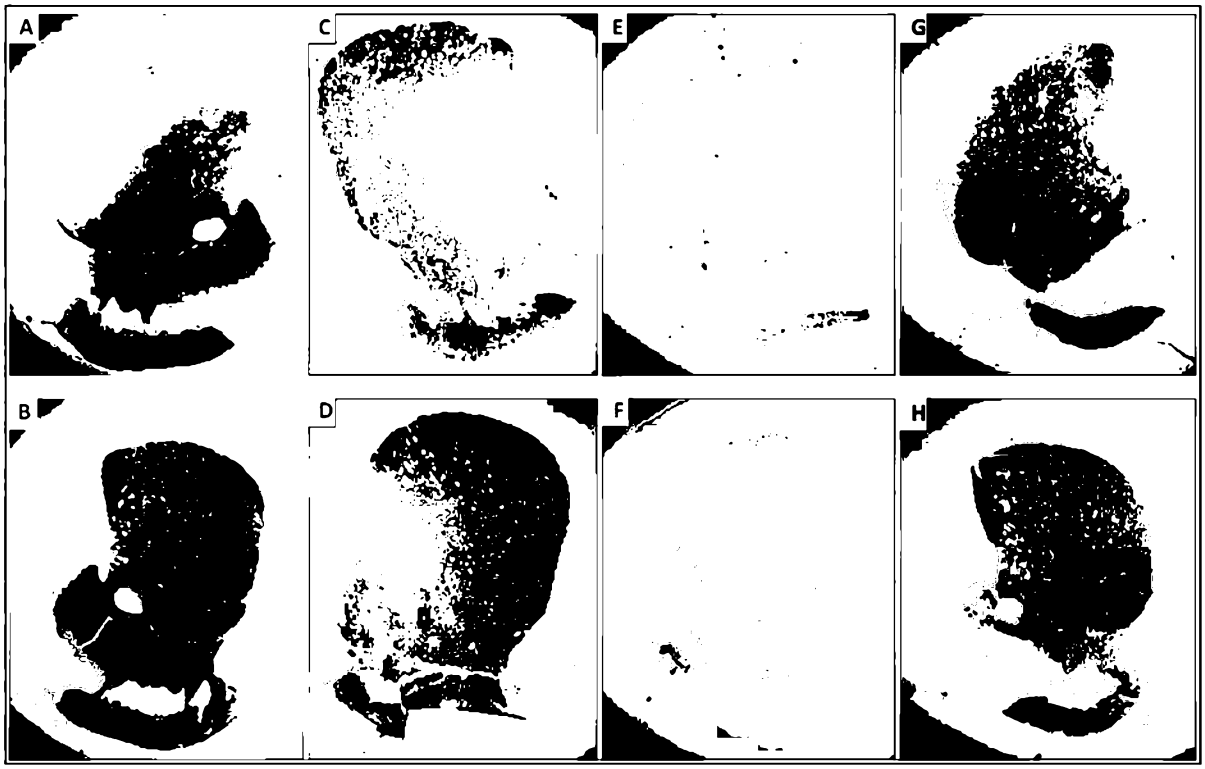


Figura 7

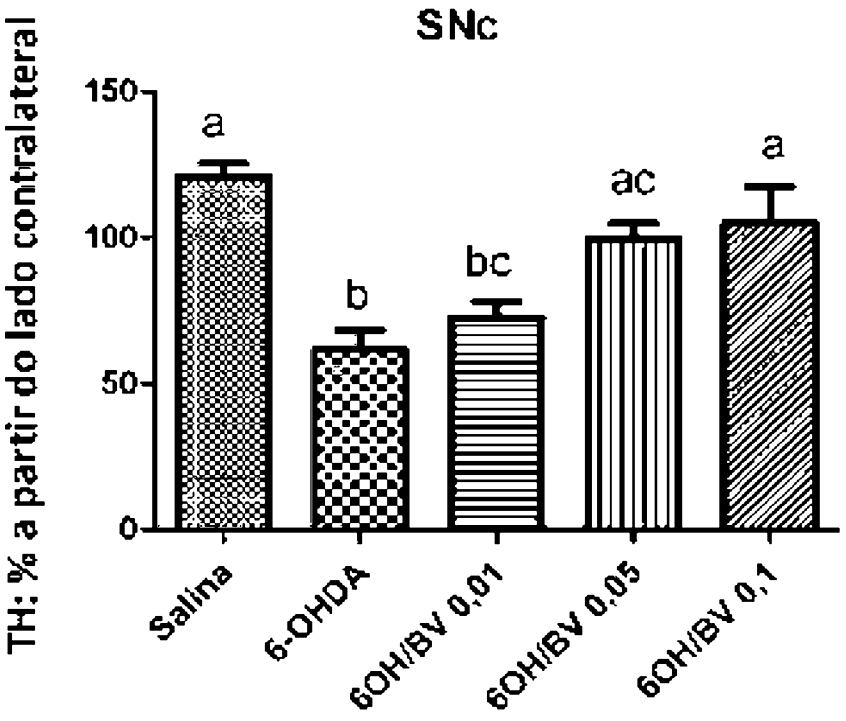


Figura 8

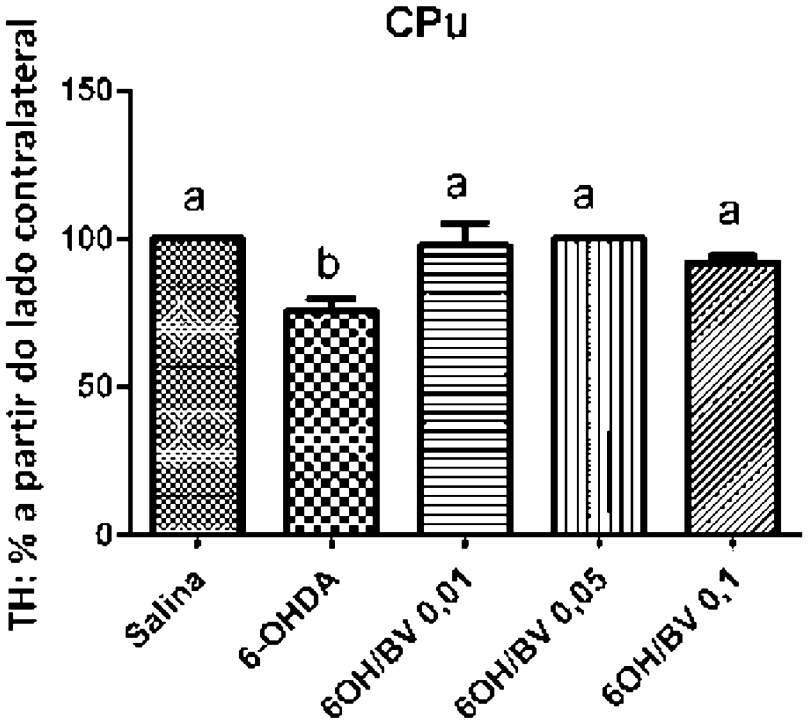


Figura 9

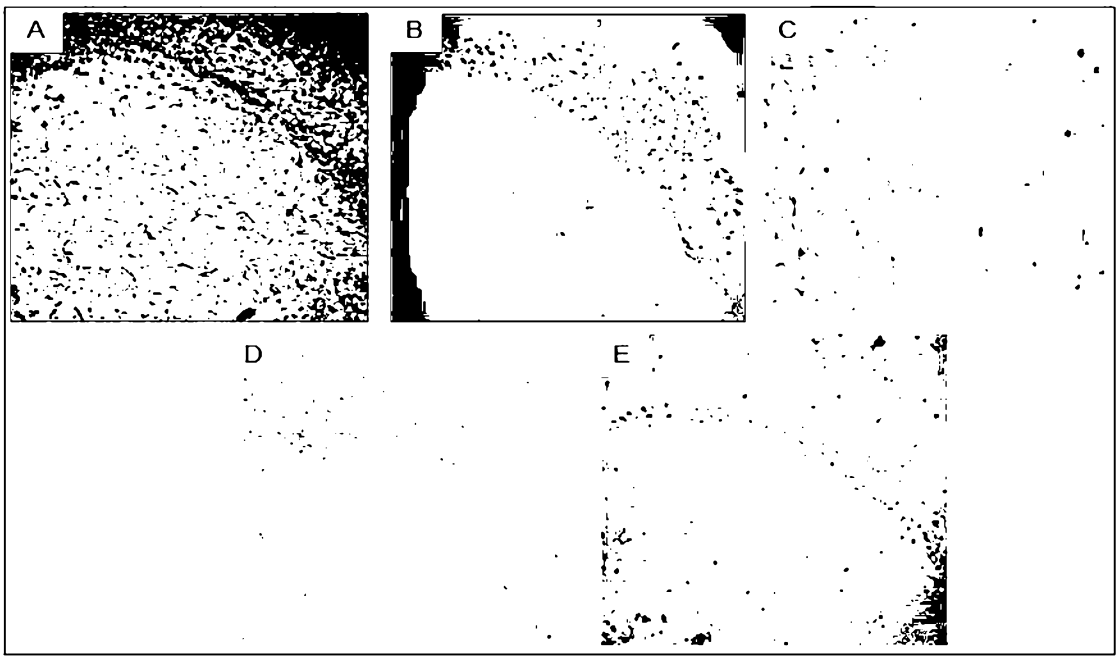


Figura 10

RESUMO

USO DO VENENO DE ABELHAS NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON E ESQUIZOFRENIA

A presente invenção se refere, preferencialmente, ao uso do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellifera Linnaeus*), com potente atividade anti-inflamatória, antioxidante e largo espectro de ação sobre o Sistema Nervoso Central, com ação terapêutica sobre a esquizofrenia e sobre a doença de Parkinson, com efeito antipsicótico e neuroprotetor, decorrentes da interação com o sistema dopaminérgico, a qual compreende os referidos compostos e um veículo farmaceuticamente aceitável.