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

(21) BR 102020026149-5 A2

(22) Data do Depósito: 18/12/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 05/07/2022

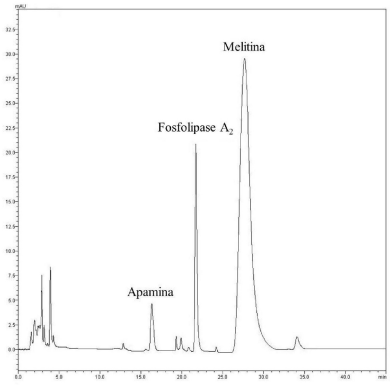
(54) Título: USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

(51) Int. Cl.: A61K 35/64; A61P 25/28.

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

(72) Inventor(es): CAMILA GOMES DANTAS; LAIANY LIMA DA CRUZ.; REVERTON GOIS SIQUEIRA.; MARGARETE ZANARDO GOMES.

(57) Resumo: USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER. A presente invenção refere-se 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 doença de Alzheimer, decorrente da interação com o mecanismo da cascata amilóide e com o sistema colinérgico, a qual compreende os referidos compostos e um veículo farmaceuticamente aceitável. A aplicação do veneno de abelhas africanizadas (Apis mellífera L.) sobre a doença de Alzheimer aumentou a atividade locomotora dos animais, aumentou a memória a curto e longo prazo e também a memória espacial, e reduziu o comportamento depressivo dos roedores. Ademais, o tratamento com veneno de abelhas africanizadas (Apis mellífera L.) gerou sobrevivência neuronal após a lesão.



USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se 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 doença de Alzheimer, decorrente da interação com o mecanismo da cascata amilóide e com o sistema colinérgico, a qual compreende os referidos compostos e um veículo farmaceuticamente aceitável.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

[002] A doença de Alzheimer (DA) tem sido apresentada nos últimos anos como a doença neurodegenerativa mais recorrente em todo o mundo, e o crescente envelhecimento populacional tem sido indicado como principal causa para os elevados índices da doença, uma vez que sua prevalência aumenta progressivamente com a idade (PRINCE et al., 2016; LIU et al., 2018). Com características neuroinflamatórias (BIRCH et al., 2014), a doença causa declínios cognitivos e comportamentais, progressivos e incapacitantes, que afetam a qualidade de vida dos indivíduos acometidos, de seus familiares e/ ou cuidadores, geram institucionalizações e gastos à saúde pública (HE; YANG et al., 2018; DARWEESH et al., 2018; LANDEIRO et al., 2018; BOSTANCIKLIONGLU, 2019).

[003] A abordagem terapêutica da doença é baseada no tratamento sintomático da deficiência cognitiva e dos problemas de comportamento afetivo (LIU et al., 2018), e os fármacos de escolha consistem em substâncias precursoras de acetilcolina e em inibidores de colinesterases, no entanto, estes medicamentos não bloqueiam o processo degenerativo e proporcionam múltiplos efeitos colaterais (RENN et al., 2018). Deste modo, o controle da

progressão da doença e a busca por novas abordagens farmacológicas mais eficazes constituem os principais objetivos dos recentes estudos na área (LIU et al., 2018).

[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 enzimas, em especial a fosfolipase A_2, têm sido relacionadas à fragmentação da proteína geradora do peptídeo beta-amilóide (Aβ), importante marcador neuropatológico da doença e causador de placas senis. Ademais, a enzima também atua sobre o sistema colinérgico favorecendo a formação de acetilcolina, neurotransmissor reduzido no cérebro de pacientes com a doença (GATTAZ et al., 1996).

[005] Outro composto do veneno de abelhas, a apamina, peptídeo que atua como bloqueador de canais de K^+ ativados por Ca^{++}, tem induzido alterações plásticas nos neurônios do hipocampo, o que pode estar relacionado à excitabilidade neuronal e ao aumento da plasticidade sináptica (ROMERO CURIEL et al., 2011). Deste modo, a administração do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellifera L.*), em que pese a sinergia de ação de todos os compostos, pode representar uma nova alternativa de tratamento da doença de Alzheimer.

ESTADO DA TÉCNICA

[006] A literatura técnica especializada revela alguns documentos de patentes que fazem referência ao tratamento da doença de Alzheimer. 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 doença de Alzheimer.

[007] 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 neste documento, tendo em vista que o conceito inventivo aqui proposto difere consideravelmente dos documentos citados e revelados.

[008] O documento de anterioridade KR1020170127257 descreve patente de invenção baseada na composição de terapia celular para prevenir ou tratar a doença de Alzheimer ou demência, compreendendo o peptídeo peptídeo beta-amilóide (Aβ) e a fosfolipase A_2 de veneno de abelha (bvPLA$_2$) como ingredientes ativos. Mais especificamente, é fornecida uma composição de vacina para prevenir ou tratar a doença de Alzheimer ou demência. O produto proposto difere da patente supracitada no que se refere à finalidade, uma vez que a presente proposta sugere a utilização do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*) como propriedade terapêutica e a patente supracitada objetiva propriedade profilática por meio de um composto do veneno (bvPLA$_2$) para composição de vacina. Adicionalmente, a origem do veneno de abelhas utilizado também difere entre os estudos, visto que os inventores citam a utilização do veneno de abelhas europeias e a presente proposta sugere a utilização de veneno proveniente de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*), que apresentam perfil químico diferenciado, por se tratarem de diferentes subespécies. A via de administração utilizada também difere

entre os estudos, uma vez que na patente supracitada a via utilizada é intraperitoneal, enquanto no presente estudo é subcutânea.

[009] O documento de anterioridade KR1020090096019 refere-se a uma composição farmacêutica para prevenir ou tratar a doença de Alzheimer, que compreende o veneno de abelhas italianas como ingrediente ativo. De acordo com os inventores, a composição farmacêutica suprime a apoptose da célula neuronal gerada pelo peptídeo beta amilóide e pode ser administrada por via subcutânea, intradérmica, venosa ou muscular. O produto proposto difere da patente supracitada no que se refere a origem do veneno de abelhas utilizado, visto que a presente proposta sugere a utilização de veneno proveniente de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*), provenientes da região Nordeste do Brasil. A dose administrada também difere entre os estudos, uma vez que na patente supracitada foi de 1 $mg.Kg^{-1}$ e no presente estudo as doses testadas foram menores, situadas entre 0,05 $mg.Kg^{-1}$ e 0,5 $mg.Kg^{-1}$, o que denota a diferença entre os perfis químicos dos venenos e sugere ação mais eficaz dos compostos químicos encontrados no veneno de abelhas africanizadas.

[0010] O documento de anterioridade KR20190009592 (A) refere-se a uma composição que compreende o veneno de Vespa mandarinia, com ação contra a formação do peptídeo beta amilóide e efeito sobre a enzima acetilcolinesterase, responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas. De acordo com o documento, a invenção pode ser usada para composição farmacológica, composição alimentar ou semelhantes, e para prevenir ou tratar a doença de Alzheimer, restringindo a resposta inflamatória de células cerebrais. O produto proposto difere da patente supracitada no que se refere ao produto natural utilizado, proveniente de outra espécie de insetos da ordem Hymenoptera.

[0011] O documento de anterioridade KR20110080383 refere-se a uma formulação contendo veneno de abelhas europeias em uma quantidade de 0,0001 a 10% (relação peso/ volume percentual), mais preferencialmente 0,01 a 1% (relação peso/ volume percentual) como ingrediente ativo para prevenir e tratar acidente vascular encefálico, doença de Parkinson e doença de Alzheimer, administrada sob formulação oral ou formulação parenteral, com dose de 0,1 a 100 $mg.Kg^{-1}$, preferencialmente 30 a 80 $mg.Kg^{-1}$, mais preferencialmente 50 a 60 $mg.Kg^{-1}$, e podendo ser administrado 1 a 6 vezes ao dia. O produto proposto difere da patente supracitada no que se refere a origem do veneno de abelhas utilizado, tratando-se, portanto, de compostos químicos com diferentes concentrações. A via de administração e as doses recomendadas também diferem entre os estudos, onde é possível observar no referido documento de anterioridade doses muito maiores que as propostas neste relatório, que estão situadas entre 0,05 $mg.Kg^{-1}$ e 0,5 $mg.Kg^{-1}$.

[0012] O documento de anterioridade US 2015/0150951 refere-se a uma composição farmacêutica para o tratamento ou prevenção de doença relacionada à supressão anormal da atividade reguladora das células T, isto é, doenças autoimunes, doenças alérgicas ou doenças neurodegenerativas. A invenção consiste na atuação da enzima fosfolipase A_2 do veneno de abelhas européias (0,01; 0,1; 1 e 10 $mg.kg^{-1}$ de peso corporal, via intraperitoneal), que ativa uma célula T reguladora e suprime uma diferenciação de Th1 / Th7. O produto proposto difere da patente supracitada no que se refere a origem do veneno de abelhas utilizado, a via de administração e as doses recomendadas entre os estudos. Ademais, o documento de anterioridade supracitado não cita a doença de Alzheimer especificamente como enfermidade a ser tratada com a invenção.

[0013] O documento de anterioridade US 2020/0030376 refere-se a um método de terapia celular para o tratamento de doenças neurodegenerativas, que inclui a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma célula T reguladora específica de beta-amilóide induzida pela administração de peptídeo beta-amilóide e fosfolipase A_2, enzima encontrada no veneno de abelha (bvPLA$_2$). O produto proposto difere da patente supracitada, uma vez que a presente proposta sugere a utilização do veneno de abelhas, em que pese a sinergia de ação de todos os compostos do veneno, e não somente a ação isolada da enzima fosfolipase A_2 e também não compreende células T regulatórias como ingrediente ativo.

[0014] O documento de anterioridade WO 2000/015774 refere-se a composições farmacêuticas com base no polipeptídeo PX3.101, uma nova proteína, que pode ser isolada do veneno de abelha; anticorpos contra o polipeptídeo e ácidos nucléicos que codificam PX3.101 e seus fragmentos. Visa utilizá-los no tratamento de doenças, incluindo doenças inflamatórias, como artrite reumatóide. O produto proposto difere da patente supracitada, uma vez que a presente proposta sugere a utilização de todo o veneno de abelhas, e não somente de um novo polipeptídeo isolado, para tratamento da doença de Alzheimer.

[0015] A literatura técnica especializada revela alguns documentos de patentes que fazem referência ao uso do veneno de abelhas e testes comportamentais.

[0016] O documento de anterioridade US 20120082656 refere-se a uma composição compreendendo o extrato purificado do veneno de abelhas europeias, com ênfase para o composto melitina, para prevenir e tratar doenças cerebrais degenerativas e seu uso. Na invenção, o extrato purificado de veneno de abelha apresentou potente efeito inibidor na ativação da célula microglial e comportamental por meio de modelo animal de doença

degenerativa do cérebro (doença de Parkinson)O produto proposto difere da patente supracitada no que se refere ao modelo animal utilizado para estudo e consequentemente nos aspectos metodológicos, uma vez que na presente proposta o objetivo é o tratamento da doença de Alzheimer.

[0017] A literatura técnica especializada revela um documento de patente que faz referência ao uso do veneno de abelhas e memória.

[0018] O documento de anterioridade EG20343 trata de um coletor de abelhas, onde o termo memória relaciona-se com a memória do programa de extração e não tem relação com o sintoma inerente ao quadro clínico da doença de Alzheimer.

[0019] Assim, e a partir dos documentos revelados, ressalta-se que o desenvolvimento do **'USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER"** 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.

[0020] 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

[0021] A presente invenção refere-se à utilização do veneno extraído de abelhas africanizadas (*Apis mellifera L.)*.

[0022] O produto apresenta potente atividade anti-inflamatória, antioxidante e largo espectro de ação sobre o Sistema Nervoso Central, com ação terapêutica sobre a doença de Alzheimer, decorrentes da interação com o mecanismo da cascata amilóide e com o sistema colinérgico.

[0023] A aplicação do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*) sobre a doença de Alzheimer aumentou a atividade locomotora dos animais, aumentou a memória a curto e longo prazo e também a memória espacial, e reduziu o comportamento depressivo dos roedores. Ademais, o tratamento com veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*) gerou sobrevivência neuronal após a lesão.

[0024] 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 doença de Alzheimer, devido às suas interações com o mecanismo da cascata amilóide, ao bloquear a ação da proteína precursora amilóide e consequente formação de placas senis, e com o sistema colinérgico, favorecendo a formação de acetilcolina. A propriedade anti-inflamatória do veneno e a ação da apamina, também podem influenciar a excitabilidade neuronal e o aumento da plasticidade sináptica

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0025] A **figura 1** anexa apresenta o Cromatograma de HPLC (λ= 280 nm) do veneno de abelhas (BV) africanizadas (*Apis mellífera* L.) proveniente do estado do Rio Grande do Norte/ Brasil.

[0026] A **figura 2** anexa apresenta resultados do parâmetro de exploração horizontal (EH) no teste de campo aberto. As colunas representam as médias

de explorações horizontais (quadrantes percorridos) nos grupos e as barras o erro padrão da média. No eixo das abscissas estão indicados, respectivamente, os tratamentos administrados. STZ: estreptozotocina; BV: veneno de abelhas. Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's; *p<0,05.

[0027] A **figura 3** anexa apresenta resultados do parâmetro de exploração vertical (EV) no teste de campo aberto. As colunas representam as médias de explorações verticais nos grupos e as barras o erro padrão da média. No eixo das abscissas estão indicados, respectivamente, os tratamentos administrados. STZ: estreptozotocina; BV: veneno de abelhas. Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's; *p<0,05.

[0028] A **figura 4** anexa apresenta o resultado do parâmetro de mobilidade no teste de suspensão em cauda. As colunas representam as médias de tempo de imobilidade (em segundos) nos grupos e as barras o erro padrão da média. No eixo das abscissas estão indicados, respectivamente, os tratamentos administrados. STZ: estreptozotocina; BV: veneno de abelhas. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey; *p<0,05; **p<0,01.

[0029] A **figura 5** anexa apresenta o resultado do parâmetro de alternações espontâneas (%) no teste de labirinto em Y. As colunas representam as médias do percentual das alternações espontâneas nos grupos e as barras representam o erro padrão da média. No eixo das abscissas estão indicados, respectivamente, os tratamentos administrados. STZ: estreptozotocina; BV: veneno de abelhas. Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's; *p<0,01; ***p<0,001.

[0030] A **figura 6** anexa apresenta o resultado do índice de reconhecimento de objetos. As colunas representam as médias e as barras apresentam o erro

padrão da média. No eixo das abscissas estão indicados, respectivamente, os tratamentos administrados. STZ: estreptozotocina; BV: veneno de abelha. Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's; *p<0,01; **p<0,01.

[0031] A **figura 7** anexa apresenta fotomicrografias representativas do tecido encefálico, na região hipocampal, após coloração por Hematoxilina & Eosina. A imagem (A) representa o grupo controle e a imagem (B) representa o grupo lesão. Aumento de 400x.

[0032] A **figura 8** anexa apresenta fotomicrografias representativas do tecido encefálico, na região hipocampal, após coloração por Hematoxilina & Eosina. A imagem (A) representa o grupo lesão, imagem B representa o grupo STZ/BV 0,05 $mg.Kg^{-1}$, imagem C representa o grupo STZ/BV 0,1 $mg.Kg^{-1}$ e a imagem D representa o grupo STZ/BV 0,5 $mg.Kg^{-1}$. Aumento de 400x.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0033] Nesta seção serão revelados todos os detalhes sobre a **'USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER'**, 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 doença de Alzheimer, da interação com o mecanismo da cascata amilóide e com o sistema colinérgico.

[0034] É importante destacar que o veneno de abelhas possui qualidades que permitem selecioná-lo para utilização do mesmo com elevado potencial terapêutico e atividade anti-inflamatória.

[0035] A aplicação do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*) sobre a doença de Alzheimer aumentou a atividade locomotora dos animais, aumentou a memória a curto e longo prazo e também a memória espacial, e reduziu o comportamento depressivo dos roedores. Ademais, o tratamento com veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*) gerou sobrevivência neuronal após lesão, caracterizando neuroproteção em modelo animal da doença. Desta forma, esta invenção consiste numa terapêutica medicamentosa inédita.

[0036] O invento proposto oferece redução significativa dos sintomas motores e cognitivos testados. A dose de administração é na faixa de 0,05 a 0,5 $mg.Kg^{-1}$, preferencialmente de 0,1 $mg.Kg^{-1}$. Ademais, o invento proposto oferece aumento da sobrevivência de neurônios remanescentes na região do hipocampo após lesão para doença de Alzheimer.

[0037] O veneno de abelhas foi comprado de um apiário no Rio Grande do Norte, 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).

[0038] Para indução do modelo experimental da doença de Alzheimer foi utilizado o seguinte produto químico comercial: Estreptozotocina (Sigma

Aldrich®, São Paulo, Brasil). Para análise cromatográfica foram utilizados: apamina, melitina e fosfolipase A_2 (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil.

[0039] O processo para utilização do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellifera L.*) consistiu nas seguintes etapas:

ETAPA 1: OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO

[0040] O veneno de abelhas foi comprado sob a forma de pó, de um apiário localizado no Rio Grande do Norte, 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).

[0041] O produto foi armazenado em frasco âmbar e sob refrigeração (10 ºC).

ETAPA 2: DISSOLUÇÃO

[0042] Para utilização, o veneno foi diluído em solução salina estéril (0,9%), com obtenção de pH 5,0. Após diluição, o veneno foi armazenado em frasco âmbar e sob refrigeração (10 ºC).

ETAPA 3: APLICAÇÃO

[0043] O veneno foi administrado via subcutânea (s.c.), em volume de 40 µL, uma vez a cada dois dias, por 2 semanas.

Análise por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

[0044] O veneno de abelhas (10 mg) foi diluído em 10 mL de ácido trifluoracético (0,1% em água milli-Q). A solução (concentração: 1 $mg.mL^{-1}$) foi centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos (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).

[0045] A análise por HPLC foi realizada utilizando o sistema de cromatografia líquida de alta performance que consiste 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).

[0046] 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.

[0047] 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

[0048] Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com massa corporal aproximada de 250 - 300 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 (Aprovação sob o número 030418).

Indução do modelo experimental da doença de Alzheimer

[0049] Os animais foram previamente anestesiados com cetamina/ xilazina (75 e 10 $mg.Kg^{-1}$, respectivamente, via intraperitoneal). Em seguida, foram posicionados no aparelho estereotáxico (Insight®, Brasil) com a fixação dos ossos temporais e aparelho mandibular. Após, foi administrada injeção subcutânea na região dorsal da cabeça, de 0,04 mL de lidocaína 3% contendo epinefrina a 2%. Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para microinjeção de 4 µL de estreptozotocina - STZ (1,5 $mg.Kg^{-1}$) ou de solução salina estéril (0,9%) utilizando uma micro seringa Hamilton 705 (10 µL) acoplada ao aparelho estereotáxico e uma bomba de infusão BI-2008. A taxa de fluxo foi de 1 $\mu L.min^{1}$, nas seguintes coordenadas (em mm em relação ao

bregma, sutura sagital e da superfície dural): AP= - 0,8; L= ± 1,5; DV= − 4,2 (DOLABATI et al., 2012; SIAHMARD et al., 2012; ARABPOOR et al., 2012). Ao final do procedimento cirúrgico, foi realizada sutura com fio Shalon®, de nylon 5 cm, cuticular; e aplicada injeção intramuscular de pentabiótico veterinário para animais de pequeno porte (Forte Dodge Saúde Animal LTDA, 0,5 mL). Ao final, os animais foram aquecidos em câmara térmica a 37 °C para recuperação da anestesia (SANZ-BLASCO et al., 2017).

Tratamento com veneno de abelhas ou salina

[0050] Após a indução da doença de Alzheimer, os animais receberam veneno de abelhas africanizadas -*Apis mellífera L.*- (dose na faixa de 0,05 a 0,5 mg.Kg ^{1}, preferencialmente 0,1 mg.Kg^{-1}, via s.c. (DOO et al., 2010; KHALIL et al., 2014) ou salina (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 2 semanas (DOO et al., 2010; MAJKUTEWICZ et al., 2016). Os efeitos funcionais foram caracterizados por meio dos testes comportamentais de campo aberto, suspensão em cauda, labirinto em Y e reconhecimento de objetos. A morte neuronal foi avaliada por meio de coloração por hematoxilina & eosina.

Testes comportamentais

[0051] Para avaliação do tratamento sobre o modelo experimental de doença de Alzheimer, foram realizados os seguintes testes comportamentais: campo aberto, suspensão em cauda, labirinto em Y e reconhecimento de objetos.

[0052] Teste do campo aberto para avaliação da atividade locomotora do animal: 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 dos animais (WHIMBEY; DENENBERG, 1967). O parâmetro avaliado foi a frequência dos comportamentos de exploração horizontal (número de quadrantes percorridos/cruzados pelo animal com as quatro patas durante a locomoção) e de exploração vertical (número de vezes que o animal permaneceu sobre as patas traseiras). 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 limpo com álcool 20% para evitar a influência do cheiro de outros animais (WHIMBEY; DENENBERG, 1967; PRUT; BELZUNG, 2003).

[0053] Teste de Suspensão em Cauda: Cada animal foi suspenso individualmente a partir de uma fita, fixada 20 cm acima do chão, e colocada a 2 cm da porção terminal da cauda do animal. Os animais foram posicionados de forma que a base da cauda estivesse alinhada com o plano horizontal e foram observados por um tempo cronometrado de 6 minutos. Os animais foram avaliados por meio dos seguintes parâmetros: tempo de imobilidade e movimento (referentes ao movimento das patas do animal na posição vertical mantendo o corpo reto, ou do seu corpo de um lado para o outro, e torções, movimentos ativos de torção do corpo inteiro), medidos em segundos.

[0054] Teste de Labirinto em Y: Avalia a capacidade da memória espacial do animal. Foi utilizado um aparato no formato da letra Y, confeccionado em madeira, com três braços iguais separados por ângulos de 120º, medindo 50 cm de comprimento, 12 cm de largura e 27 cm de altura. Para a realização do teste, os braços do equipamento em Y foram numerados com valores distintos. Em seguida, o animal foi colocado no aparelho e durante 8 minutos foram observados os braços que o animal entrou e foi contabilizado como acerto cada

vez que entrou em 3 braços diferentes sem repetição. O resultado foi expresso em porcentagem e obtido pela fórmula matemática abaixo (SARTER et al., 1988; STONE et al., 1991). Ao final de cada teste, o equipamento foi higienizado com álcool a 10%.

$$\text{Alternações espontâneas (\%)} = \frac{\text{Número de acertos}}{\text{Número total de entradas - 2}} \times 100$$

[0055] Teste de Reconhecimento de Objetos: Avalia a memória de curto e longo prazo. Foi utilizado o mesmo equipamento onde foi realizado o teste do campo aberto, descrito anteriormente. Os objetos foram confeccionados em duplicata, com cerca de 5 cm de altura, cor branca, nas formas de bola, triângulo e quadrado, demasiadamente pesados para não serem deslocados pelos animais. No primeiro dia da tarefa cada animal foi colocado individualmente na caixa para habituação, sem nenhum objeto no aparato. Após 24 h, o animal foi colocado novamente na caixa com dois objetos iguais (objeto A) e (objeto A1) e deixado por um período de 5 minutos para que o animal explorasse os objetos na seção treino. No mesmo dia, 1h30min. após o treino, foi realizada a seção teste, para avaliar a memória de reconhecimento de curto prazo, onde cada animal foi colocado novamente na caixa com um objeto semelhante (objeto A) e outro objeto diferente (objeto B), com tempo de exploração de 5 minutos. A exploração foi definida quando o animal dirigisse o nariz a 2 cm do objeto enquanto o observava, ou o inalasse, ou tocasse o objeto. Para avaliar a memória de reconhecimento de longo prazo, 24 h após a realização da tarefa de curto prazo, foi realizada a seção teste de longo prazo, com dois objetos, um que o animal já estava familiarizado (objeto A) e outro distinto de todos (objeto C). O aparato da tarefa foi limpo com solução de

etanol 10% entre os testes. Para a análise dos resultados foi utilizado o índice de reconhecimento, que é calculado de acordo com a fórmula TB/(TA + TB) onde o TA é o tempo gasto para explorar o objeto já conhecido pelo animal e TB é o tempo gasto para explorar o objeto novo (ENNACEUR; DELACOUR, 1988).

Eutanásia e Procedimentos Histológicos

[0056] Os animais foram eutanasiados por meio de sobredosagem da associação de anestésicos dissociativos (cetamina) e agonistas de adrenorreceptores alfa-2 (xilazina), administrados via intraperitoneal, e tiveram os encéfalos retirados para análise histológica (FRANCARDO et al., 2011). Os cortes histológicos (espessura de 5 µm) foram submetidos à coloração de rotina por Hematoxilina e Eosina (HE). Em seguida, as imagens foram avaliadas de forma cega quanto ao grupo experimental, determinando a presença de alterações histopatológicas.

[0057] As modificações histológicas decorrentes da lesão e da associação com os tratamentos foram analisadas por meio da coloração de HE (EMERY et al., 1998; WADA et al., 1999). A técnica da coloração consiste em manter as secções do tecido em contato com a hematoxilina de *Harris* por 90 s, lavar em água corrente por 5 min, submergir em solução de água amoniacal, por 15 s, lavar em água corrente por 5 min. e corar com a solução de eosina por 30 s. A seguir as lâminas foram desidratadas e submetidas a uma bateria de álcoois em concentração crescente, a uma mistura de álcool e xilol e a xilol puro (3 min cada) para então serem montadas com lamínulas. Por meio desta coloração foram avaliados os aspectos estruturais e o perfil das alterações inflamatórias.

[0058] As análises foram realizadas por meio de imagens obtidas ao microscópio acoplado à câmera fotográfica Olympus (aumento de 400X). Para

que a análise histológica fosse realizada às cegas quanto ao grupo experimental, os códigos de identificação de cada lâmina foram cobertos por outro experimentador antes do início da análise e revelados após seu término. As regiões foram identificadas de acordo com ilustrações apresentadas no atlas de Paxinos e Watson (2013).

RESULTADOS

[0059] 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 16,4; 21,9 e 28,3 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.

[0060] 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

[0061] No teste de campo aberto, no que se refere ao parâmetro motor de exploração horizontal (EH), observa-se que o grupo lesão reduziu significativamente esse parâmetro em comparação ao grupo controle. O grupo que recebeu veneno de abelhas (BV) na dose de 0,1 $mg.Kg^{-1}$, também reduziu

significativamente esse parâmetro em relação ao grupo controle. Animais tratados com BV 0,05 mg.Kg^{-1} reduziram significativamente as explorações horizontais em relação ao grupo STZ/BV 0,1 e o grupo STZ/BV 0,5 também reduziu significativamente este parâmetro motor em relação ao grupo STZ/BV 0,01. Estes dados podem ser observados na Figura 2.

[0062] No que se refere ao parâmetro motor de explorações verticais (EV), observa-se que o grupo STZ/BV 0,1 aumentou significativamente este parâmetro em relação ao grupo lesão, conforme Figura 3.

[0063] No teste de suspensão em cauda, que avalia o comportamento depressivo dos animais, observa-se que o grupo lesionado aumentou significativamente o tempo de mobilidade em comparação ao grupo controle e em comparação aos grupos STZ/BV 0,05 e STZ/BV 0,1, conforme Figura 4.

[0064] A avaliação da memória espacial foi realizada por meio do teste de labirinto em Y e observou-se que o grupo tratado com BV na dose de 0,05 mg.Kg^{-1} aumentou significativamente as alternações espontâneas em relação ao grupo lesionado. Animais do grupo STZ/BV 0,1 aumentaram significativamente este parâmetro em relação ao grupo STZ/BV 0,05, conforme Figura 5.

[0065] No teste de reconhecimento de objetos, animais do grupo lesionado reduziram significativamente o índice de reconhecimento em relação aos animais do grupo controle. Em contrapartida, animais que receberam veneno na dose 0,1 mg.Kg^{-1} aumentaram significativamente este índice em relação ao grupo lesionado, conforme Figura 6.

[0066] A análise qualitativa da marcação por coloração hematoxilina e eosina (HE) permite inferir que os encéfalos dos animais do grupo lesão, que receberam STZ/salina, referindo-se respectivamente a microinjeção

intracerebroventricular e ao tratamento sistêmico, apresentaram redução de celularidade e maior presença de células microgliais na região hipocampal em comparação com o grupo controle, conforme Figura 7. Mediante associação ao tratamento com BV, observa-se que o grupo tratado com 0,1 $mg.Kg^{-1}$, apresentou maior preservação neuronal, em comparação aos demais grupos tratados (Figura 8).

[0067] Desta forma, conclui-se que a administração do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*), com dose na faixa entre 0,05 a 0,5 $mg.Kg^{-1}$, preferencialmente de 0,1 $mg.Kg^{-1}$, reduziu os sintomas motores e cognitivos na

no modelo experimental da doença de Alzheimer esporádica. O mecanismo de ação possivelmente relaciona-se a sinergia de ação dos compostos do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellifera L*.), que bloqueiam o desenvolvimento fisiopatológico da doença, agindo sobre a proteína precursora amilóide, impedindo sua clivagem proteolítica e consequente produção do peptídeo beta amilóide, que resulta em formação de placas senis e morte celular. Também, conclui-se que o tratamento com veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellifera L*.) teve efeito neuroprotetor sobre o modelo estudado, tendo reduzido a morte neuronal induzida por STZ em roedores.

REIVINDICAÇÕES

1- **USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER** caracterizado por ser utilizado de maneira isolada para tratamento dos sintomas motores e cognitivos da doença de Alzheimer.

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

3- **USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER** *,* de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por referido veneno da abelha *A. melífera L.* ser obtido através de extração elétrica.

4- **USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER ,** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por apresentar ação anti-inflamatória, neuroprotetora, terapêutica e antioxidante.

5- **USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER,** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela sua aplicação interagir com o mecanismo da cascata amilóide e com o sistema colinérgico.

6- **USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER,** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo tratamento ser administrado em doses na faixa de 0,05 $mg.Kg^{-1}$ e 0,5 $mg.Kg^{-1}$, preferencialmente de 0,1 $mg.Kg^{-1}$, através de via subcutânea, uma vez a cada 2 dias no período de 2 semanas.

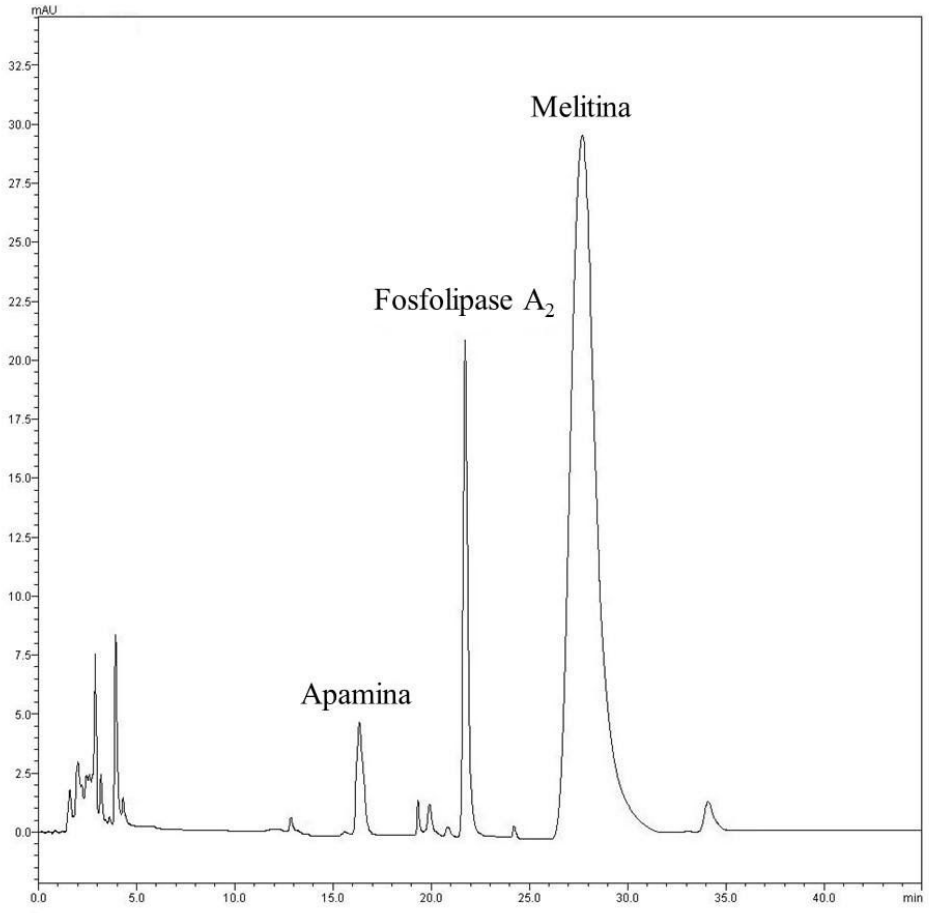

mAU
32.5
30.0
27.5
25.0
22.5
20.0
17.5
15.0
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
Melitina
Fosfolipase A_2
Apamina
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
min

FIGURA 1

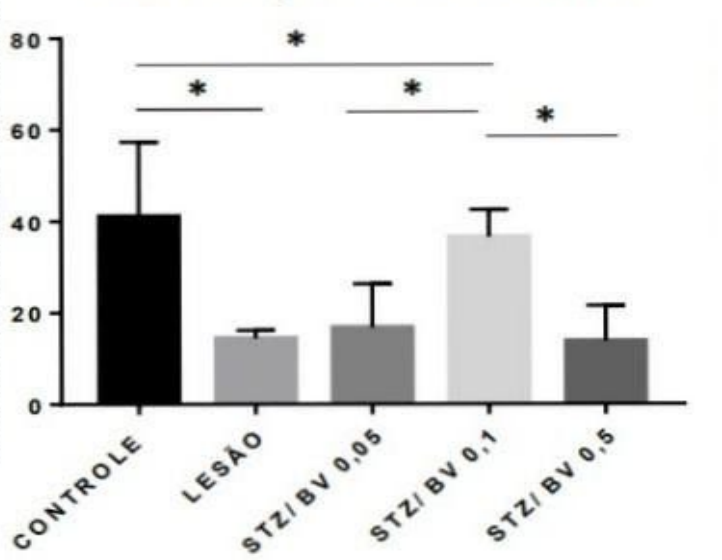


FIGURA 2

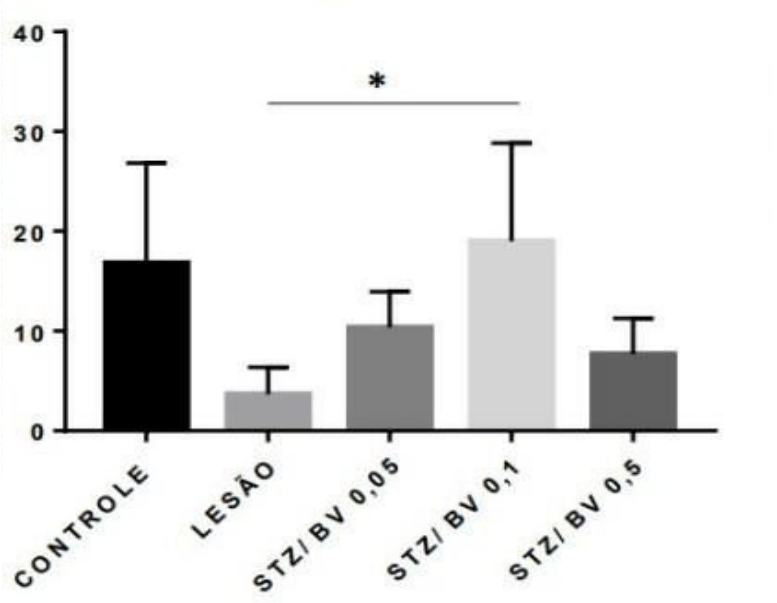


FIGURA 3

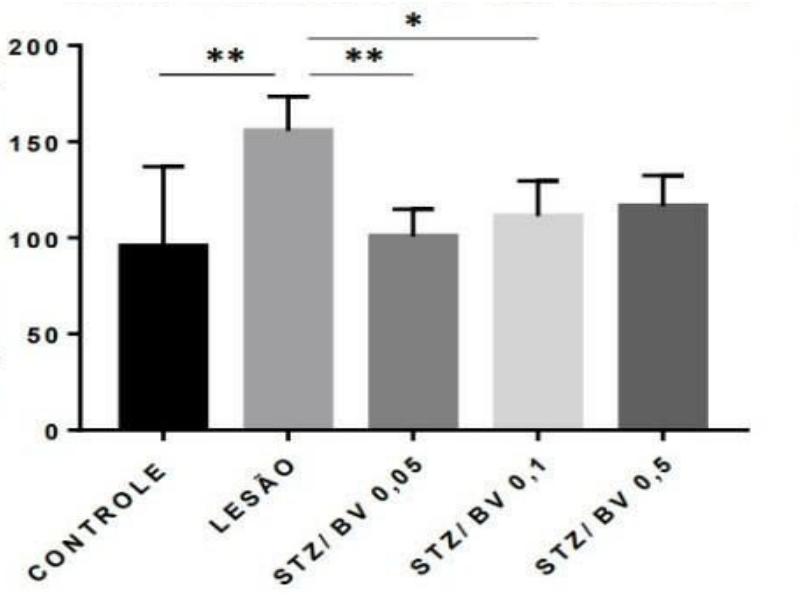


FIGURA 4

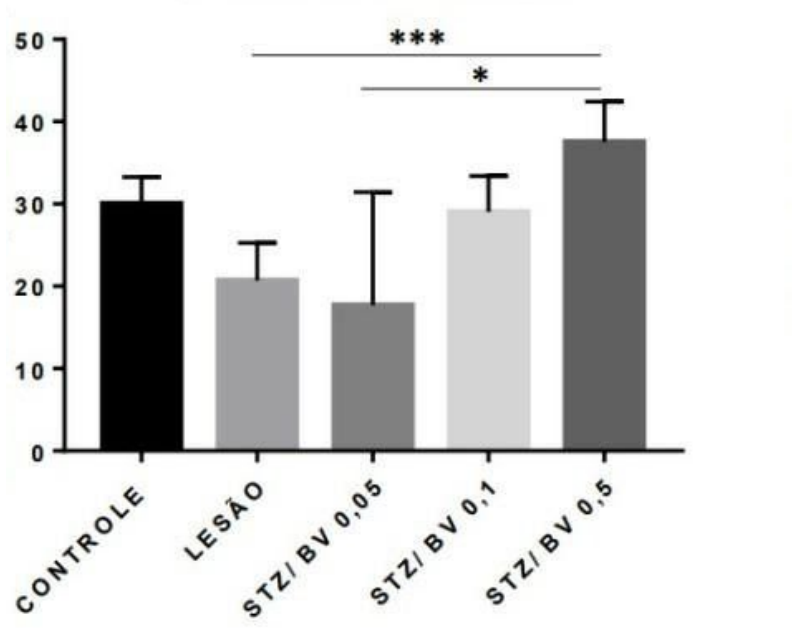


FIGURA 5

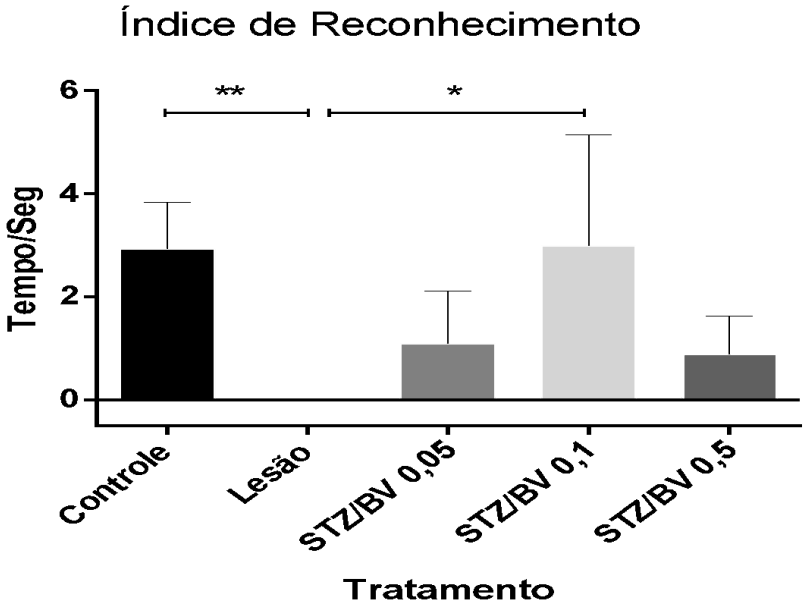


FIGURA 6

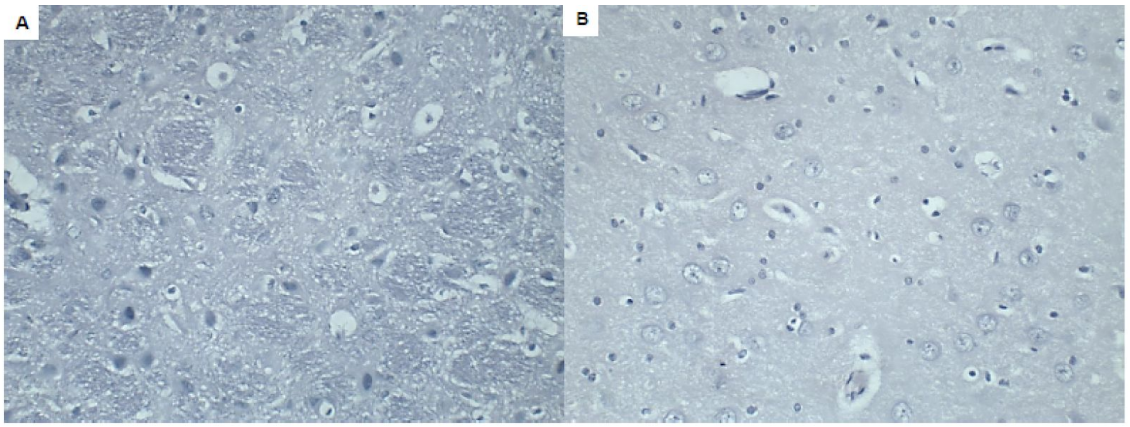


FIGURA 7

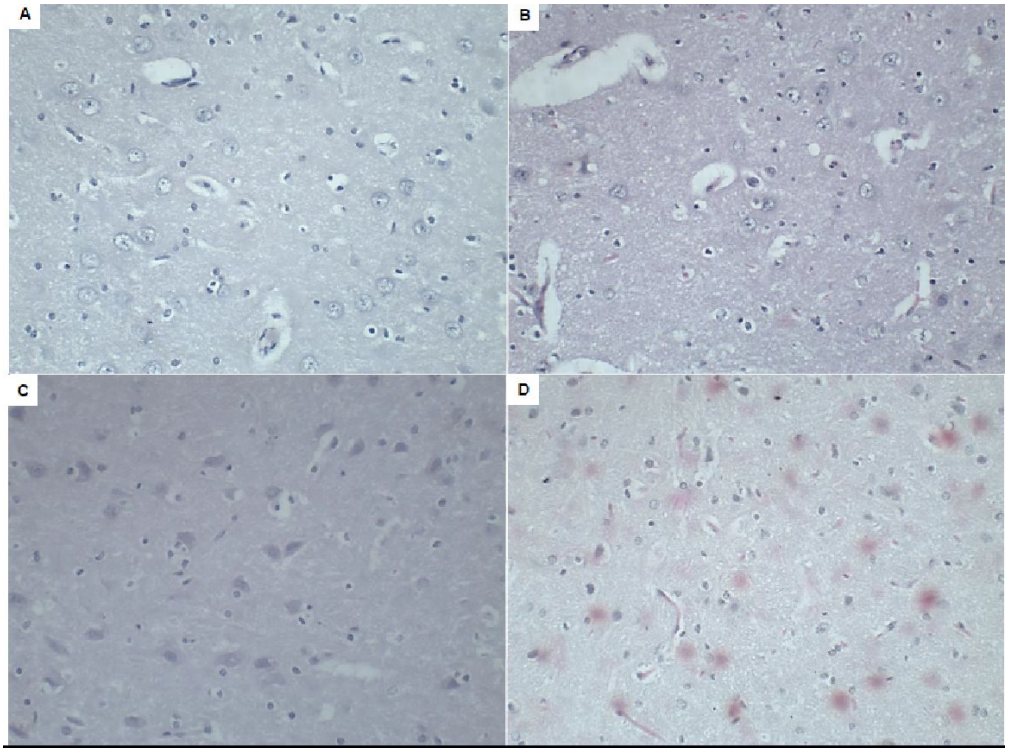


FIGURA 8

RESUMO

USO DO VENENO DE ABELHAS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

A presente invenção refere-se 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 doença de Alzheimer, decorrente da interação com o mecanismo da cascata amilóide e com o sistema colinérgico, a qual compreende os referidos compostos e um veículo farmaceuticamente aceitável. A aplicação do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*) sobre a doença de Alzheimer aumentou a atividade locomotora dos animais, aumentou a memória a curto e longo prazo e também a memória espacial, e reduziu o comportamento depressivo dos roedores. Ademais, o tratamento com veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellífera L.*) gerou sobrevivência neuronal após a lesão.