



Neuropharma
lab



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Novos análogos da Fraternalina: avaliação do efeito antiparkinsoniano em modelo murino da Doença de Parkinson e identificação dos alvos farmacológicos.

ANDREIA BIOLCHI MAYER

BRASÍLIA – DF, 2018



Neuropharma
lab



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Novos analógos da Fraternina: avaliação do efeito antiparkinsoniano em modelo murino da Doença de Parkinson e identificação dos alvos farmacológicos.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biologia Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Renata Mortari.

ANDREIA BIOLCHI MAYER

Brasília-DF, 2018

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente este trabalho a Deus, meu Rei, fonte de toda alegria e paz e que sempre esteve e está acima de tudo na minha vida. E ao meu marido, presente em todos os momentos da minha vida, amigo, companheiro e paciente, sempre dedicado a me ajudar com sua disposição, sua confiança me transmitiu forças para a realização deste trabalho, e a minha filha, uma benção concedida por Deus, que me deu o privilégio e a responsabilidade para continuar em frente.

“Você dará vida a seus sonhos mediante a maneira como fala e pensa.

Mediante a visão que desenvolver em sua vida”.

J.R. Román

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Márcia, por todo incentivo, colaboração, por estar sempre presente em todos os momentos e por toda paciência.

A minha família, que me incentivaram com seus conselhos, palavras de ânimo, nunca deixaram de acreditar em mim.

À Priscilla Galante Ribeiro pela grande amizade e apoio.

Aos meus cunhados, cunhadas e sobrinhos, pelo incentivo e compreensão.

Aos professores do LTx, Elisabeth, Carlos (*In Memoriam*), Osmino, pelos ensinamentos.

Aos alunos da Ls Educacional, em especial ao Michael que sempre esteve disposto a me ajudar.

Aos técnicos que se dispuseram do seu tempo para ajudar.

Ao grande companheiro de experimentos, Henrique, que sempre me ajudou com muita eficiência, responsabilidade e dedicação.

Aos amigos e colegas da farmacologia e do LTx, principalmente a Solange Rego, que sempre estive ao meu lado me incentivando e compartilhando todos os momentos.

A Professora Anamélia Bocca e ao Rafael de Castro do Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA), pela importante parceria com os experimentos.

Ao DPP-UnB e CNPq, à CAPES e FAPDF, pelo apoio financeiro.

Ao PPG BioAni, pela oportunidade.

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é uma das afecções neurodegenerativas crônicas mais frequentes relacionadas ao movimento, caracterizada pela perda irreversível de neurônios da via nigroestriatal. O principal tratamento é a utilização crônica de precursores da dopamina que causam fortes efeitos adversos (discinesias) e são incapazes de modificar o curso da doença. Portanto, o desenvolvimento de novos fármacos com menores efeitos colaterais tornou-se extremamente importante. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antiparkinsoniana de três peptídeos análogos a Fraternina em um modelo murino de Doença de Parkinson. Para o modelo experimental, os animais foram divididos em grupos (n = 8/grupo): controle negativo, grupo com a lesão por 6-hidroxidopamine (6-OHDA) (40 µg/animal) tratado com veículo e o grupo tratado com os peptídeos sintéticos (Fraternina-24, Fraternina-14 e Fraternina-10) em 3 diferentes concentrações. Os tratamentos com os peptídeos e veículo foram realizados por via intracerebroventricular, uma hora após a lesão e durante os dois dias seguintes. Além dos ensaios comportamentais de avaliação da coordenação motora (Rotarod e rotações induzidas por apomorfina), foram feitas quantificações do número de neurônios dopaminérgicos na substância negra e de mediadores inflamatórios. Após as análises, observou-se que todos os peptídeos foram capazes de diminuir significativamente o número de rotações contralaterais ($p < 0,01$) induzidas por apomorfina, porém apenas o Fraternina-14 apresentou um efeito significativo na permanência dos animais no Rotarod. Com relação à quantificação de neurônios dopaminérgicos, verificou-se que todos os peptídeos foram capazes de reduzir a perda neuronal ($p < 0,05$). Somado a isso, a maior dose de 7,2 nmol do peptídeo Fraternina-24 apresentou um efeito relevante na diminuição da liberação da citocina TNF- α . Desta forma, substâncias que alteram o curso da morte neuronal tornam-se promissoras moléculas de investigação farmacológica, uma vez que advém de substâncias naturais e que podem ser utilizadas não somente como atenuantes dos sinais clínicos motores e não motores da DP, mas como um futuro fármaco que favoreça a sobrevivência das células acometidas por esta doença.

Palavras-chave: Doenças neurodegenerativas, peptídeos sintéticos, peçonha de vespa, Doença de Parkinson.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is one of the most serious chronic neurodegenerative diseases related to movement, characterized by the irreversible loss of neurons in the nigrostriatal pathway. The main treatment is the chronic use of precursors of dopamine that cause strong adverse effects and are incapable of altering the course of the disease. Therefore, the development of new and more effective drugs is extremely important. The aim of the present study was to evaluate the antiparkinsonian activity of three synthetic peptides, analogs of Fraternalin, in a murine model of PD. For the experimental model, the animals were divided into groups (n = 8 / group): negative control; group with lesion by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (40 µg / animal); group treated with synthetic peptides (Fraternalin-24, Fraternalin-14 and Fraternalin-10) in 3 different concentrations. The treatments were via intracerebroventricular, one hour after the lesion and during the next two days. In addition to behavioral assessments of motor coordination (Rotarod and apomorphine-induced rotations), quantifications of the number of dopaminergic neurons in the substantia nigra and inflammatory mediators were performed. After the analysis, all the peptides were able to significantly decrease the number of contralateral (p <0.01) rotations induced by apomorphine, but only Fraternalin-14 had a significant effect on the length of time the animals stayed in the Rotarod. Regarding the quantification of dopaminergic neurons, it was verified that all the peptides were able to reduce neuronal loss (p <0.05). In addition, the higher dose of 7.2 nmol of the Fraternalin-24 peptide had a significant effect on the decrease in the release of the cytokine TNF-α. Substances that alter the course of neuronal death constitute an essential and promising target for pharmacological research using natural molecules. These may be used not only to attenuate clinical motor and non-motor signals of PD, but also as a future pharmaceutical that favors the survival of cells affected by this disease.

Keywords: Neurodegenerative diseases, synthetic peptides, wasp venom, Parkinson's disease.

LISTA DE FIGURAS

- 1 Diagrama esquemático demonstrando as vias hiperdireta composta pelos núcleos córtex-NST-GPi/SNr ,pela via indireta representada pelos núcleos córtex-estriado-GPe-NST-GPi/SNr e pela a via direta organizado em córtex-estriado-GPi/SNr. As setas brancas correspondem as projeções excitatórias glutamatérgicas (glu) e as setas pretas compreendem as projeções inibitórias GABAérgicos (GABA). Adaptado de Nambu et al (2005). 28
- 2 Figura ilustrativa dos principais mecanismos desencadeadores da resposta neuroinflamatória e oxidativa na DP. Diferentes vias de ativação primária como idade, exposição a neurotoxinas ambientais, lesão cerebral ou infecção e alterações genéticas podem convergir em uma interação complexa ocasionando a neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos mediante uma resposta neuroinflamatória. Adaptado de Taylor, Main e Crack (2013). 39
- 3 A ativação excessiva dos receptores de glutamato leva a uma disfunção mitocondrial causada por perturbações na homeostase do cálcio culminando na ativação das caspases, dano oxidativo, estresse oxidativo e morte celular. Adaptado de Bretón e Rodríguez (2012). 46
- 4 Representação esquemática da cadeia de aminoácidos do peptídeo selvagem Fraternina e das alterações realizadas para os peptídeos sintéticos. As mudanças consistiram na alteração dos aminoácidos K/Q e na amidação da região C-terminal para o peptídeo Fraternina-24 e na redução dos 10 primeiros resíduos de aminoácidos com a permanência da ponte dissulfeto para o peptídeo Fraternina-14. A retirada da ponte dissulfeto entre os aminoácidos 11 e 24 e redução deste em 14 resíduos de aminoácidos foi realizada para o peptídeo Fraternina-10. 56
- 5 Procedimento neurocirúrgico. Em A: exposição do crânio e da linha do bregma. B: Lesão estriatal dopaminérgica com infusão de 40µg/4µL de 6-OHDA diretamente no Estriado esquerdo utilizando uma bomba de infusão com um fio de polietileno acoplado a uma seringa Hamilton de

10 µL. Em C: procedimento de implantação da cânula guia (10mm) e do parafuso na região do ventrículo lateral direito. Em D: animal após a recuperação dos procedimentos neurocirúrgicos. Todos os procedimentos seguirão as coordenadas estereotáxicas (em mm) em relação ao Bregma.

65

6 Imagem digital do cérebro de camundongo, indicando a região de inserção da agulha de injeção com a substância neurotóxica 6-OHDA na região do Estriado esquerdo em A. Posição de inserção da cânula guia infundida na região do ventrículo lateral direito para o direcionamento e correta administração dos compostos em estudo. Imagem: Allen Mouse Brain Atlas (Gabriel Avohay).

66

7 Imagem representativa dos animais lesionados por 6-OHDA e dos animais que receberam o veículo na região do estriado. Em A, animal doente apresentando alterações na curvatura da coluna dorsal com severo emagrecimento e extrema descoordenação motora quando submetido ao teste do rotarod. Em B, animal pertencente ao grupo controle veículo, com a infusão do veículo (ácido ascórbico á 0,2%) apresentando comportamento exploratório e com conservado peso corpóreo. Foto: Andreia Biolchi Mayer.

67

8 Esquema ilustrativo do delineamento experimental utilizado para a administração dos peptídeos ou veículo em estudo. No primeiro dia, os animais receberam uma injeção intraestriatal de 40µg/4 µL de 6-OHDA e uma cânula-guia foi implantada no ventrículo cerebral direito. Os compostos foram administrados por via i.c.v. 1h, 48h e 96h após a infusão de 6-OHDA pela cânula guia implantada durante o mesmo procedimento.

68

9 Esquema geral ilustrativo do delineamento experimental. A administração dos peptídeos ou veículo em estudo e os ensaios comportamentais foram realizados durante os sete dias de experimento. No primeiro dia, os animais receberam uma injeção intraestriatal de 40ug/4 µL de 6-OHDA e uma cânula-guia foi implantada no ventrículo cerebral direito. A avaliação da coordenação motora foi verificada no segundo, terceiro e quarto dia após a lesão. No sexto dia foi realizado o

- teste de comportamento rotatório após desafio com a apomorfina seguindo para a histologia. 71
- 10 Representação esquemática das formas de verificação da correta posição da cânula guia para administração das injeções do tratamento. Em A, fatia cerebral de camundongo com 50 μ m de espessura mergulhada em sacarose a 30% demonstrando o rasgo da cânula guia. B: Marcação com o corante azul de metileno em uma fatia do cérebro de camundongo utilizada no experimento (Fonte Anjos, 2016). 74
- 11 Imagem demonstrativa para quantificação de neurônios reativos a TH na região da SN. Foram considerados somente os neurônios que continham os citoplasmas que emitiam a fluorescência em verde (Veículo/Alexa flúor-488) e os núcleos marcados a partir de um meio de montagem Fluorescente Média com DAPI (Veículo/ Dapi). Foram contabilizados os neurônios que continham seus citoplasmas e núcleos que emitiam a fluorescência (Sadio/ Sobreposição). 76
- 12 Equipamento Precellys. Foto: Andreia Biolchi Mayer (Fev. 2018). 78
- 13 Representação esquemática da preparação das membranas e separação da Fração de Membranas Sinaptossomal (FMS). 81
- 14 Representação esquemática do gradiente descontínuo de sacarose (GDS) antes e após ultracentrifugação. Em A: após a preparação do gradiente a amostra é que está em solução sacarose 0,32M, indicado pela seta azul é inserida acima da última camada do gradiente, as fases do GDS só são visíveis quanto o tubo é mantido contra a luz. Em B: após a ultracentrifugação, o homogeneizado irá separar-se em várias frações. A fração apresentada entre as camadas de 0,8 e 1,0M de sacarose é constituída de membranas de mielina. A fração inserida entre as camadas 1,0 e 1,2M de sacarose apresenta a FMS que foi recolhida com o auxílio de uma pipeta pasteur, o sedimento formado no fundo do tubo corresponde as mitocôndrias. Em C: representação esquemática das camadas organizadas em por diferentes concentrações de sacarose (0,8M; 1,0M e 1,2M) e da separação da fração de PMS isolada com base na sua densidade sendo apresentada entre as interfases de 1,0M e 1,2M de sacarose. 82

- 15 Representação esquemática da metodologia para o ensaio estudos de ligação (binding). 84
- 16 Alinhamentos das sequências primárias de aminoácidos dos peptídeos sintéticos Fraternina-24, Fraternina-14 e Fraternina-10 modificado da peçonha vespa social *Parachartergus fraternus*. São exibidas comparações com outras sequências anteriormente descritas na peçonha de Himenópteros. (AA) corresponde à quantidade de aminoácidos. (%ID) corresponde ao percentual de identidade dos peptídeos em relação aos outros peptídeos presentes na representação. (*) resíduo igual; (:) modificação conservativa; (.) modificação semi-conservativa; espaço em branco corresponde a ausência de identidade entre os resíduos. 87
- 17 Representação do modelo da estrutura tridimensional dos peptídeos sintéticos Fraternina-24, Fraternina-14 e Fraternina-10 desenvolvido pelo método Threading gerado pelo servidor I-Tasser (Iterative Threading Assembly Refinement) <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> e pelo Método de novo realizado pelo servidor QUARK <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/QUARK/>. Em A, representação do Peptídeo Fraternina-24 pelo servidor I-Tasser com a presença predominante da conformação em alfa hélice, com as extremidades randômicas e livres evidenciando pelas regiões flexíveis da molécula. Em B, representação do Peptídeo Fraternina-24 pelo servidor QUARK, o peptídeo apresenta conformação do tipo alfa-hélice, ligação entre duas cisteínas chamada de ponte dissulfeto entre o aminoácido 11 e o aminoácido 24 da região C-terminal da molécula. Em C e em D, interações eletrostáticas (Potencial Eletrostático-PE) entre os átomos determinadas pelas cargas apresentadas pelos aminoácidos. Regiões negativas em vermelho e as regiões positivas em azul. Em E, modelo da estrutura tridimensional do peptídeo Fraternina-10 desenvolvido pelo método Threading gerado pelo servidor I-Tasser (Iterative Threading Assembly Refinement) <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> e em F, modelo da estrutura tridimensional do peptídeo Fraternina-14

desenvolvido pelo método Threading gerado pelo servidor I-Tasser (Iterative Threading Assembly Refinement) <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>. Em G, representação do modelo obtido da estrutura tridimensional do peptídeo 1 truncado glucakon-like (GLP-1), exendina-4 e o peptídeo pl14a (α -conotoxina). Em H, modelo obtido da estrutura tridimensional da Proteína p9 GAG do vírus da anemia infecciosa equina – PDB ID 2K84 e em I, estrutura modelo da Toxina MMP23 (metaloproteinase 23) de *Rattus norvegicus* com ação moduladora de canais de potássio – PDB ID 2K72.

90

18 Efeito dos peptídeos sintéticos no teste de coordenação motora nos tempos 48, 72 e 96 horas após o insulto por 6-OHDA. Grupos controles: 6-OHDA (6-OHDA, n= 7) e grupo Veículo (Veículo, n = 6) e grupo L-DOPA (L-DOPA, n = 8). Em A: Fraternina-24; 7,2 nmol (n=8), 3,6 nmol (n=9), 0,36 nmol (n=5), 1,8 nmol (n=8), 0,18 nmol (n=8). Em B: Fraternina-14; 6,4 nmol (n=8), 3,2 nmol (n=7), 0,6 nmol (n=8). E em C: Fraternina-10; 8,3 nmol (n=8), 4,1 nmol (n=9), 0,8 nmol (n=10).

94

19 Efeito dos tratamentos no teste de permanência 6 horas. Tempo em segundos que os animais permaneceram no Rota rod em 13 avaliações diferentes após a lesão. Grupos controles: 6-OHDA (6-OHDA, n= 8) e grupo veículo (veículo, n = 8) e grupo L-DOPA (L-DOPA, n = 8). Em A: peptídeo Fraternina-24 (7,2 nmol (n=8), 3,6 nmol (n=9), 0,36 nmol (n=5), 1,8 nmol (n=5), 0,18 nmol (n=8). Em B: Fraternina-14 (6,4 nmol (n=8), 3,2 nmol (n=7), 0,6 nmol (n=8). Em C: Fraternina-10 (8,3 nmol (n=8), 4,1 nmol (n=8), 0,8 nmol (n=10). Tratamentos com diferenças significativas * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle 6-OHDA + Veículo.

97

20 Efeito dos peptídeos sintéticos na avaliação da neurotoxicidade. Grupos controles: 6-OHDA (6-OHDA, n= 5) e grupo veículo (veículo, n = 5). Em A: as doses do peptídeo Fraternina-24 foram: 7,2 nmol (n=5), 3,6 nmol (n=5), 1,8 nmol (n=5). Em B: as doses do peptídeo Fraternina-14 foram: 6,4 nmol (n=6), 3,2 nmol (n=6), 0,6 nmol (n=6). Em C: as doses do peptídeo Fraternina-10 foram: 8,3 nmol (n=8), 4,1 nmol (n=8), 0,8 nmol (n=6). Tratamentos com diferenças significativas # ($p < 0,01$), em

- relação a 6-OHDA e * ($p < 0,01$) em relação ao grupo L-DOPA. 100
- 21 Comportamento rotatório após desafio com apomorfina (agonista dopaminérgico) injetado por via s.c. (5ug/animal) em camundongos previamente injuriados com 6-OHDA. Grupos controles: 6-OHDA (6-OHDA, $n = 8$), grupo Veículo (Veículo, $n = 8$) e tratamento com L-DOPA/ Benserazida ($n=8$). Em A: as doses do peptídeo Fraternina-24 foram: 7,2 nmol ($n=6$), 3,6 nmol ($n=9$), 1,8 nmol ($n=8$). Em B: as doses do peptídeo Fraternina-14 foram: 6,4 nmol ($n=10$), 3,2 nmol ($n=6$), 0,6 nmol ($n=7$). Em C: as doses do peptídeo Fraternina-10 foram: 8,3 nmol ($n=8$), 4,1 nmol ($n=6$), 0,8 nmol ($n=10$). Tratamentos com diferenças significativas # ($p < 0,01$), em relação a 6-OHDA e * ($p < 0,01$) em relação ao grupo L-DOPA. 103
- 22 Determinação pela porcentagem de neurônios dopaminérgicos viáveis imunoreativos a TH em fatias cerebrais da região SN. Grupos controles: 6-OHDA (6-OHDA, $n = 8$), Veículo (Veículo, $n = 6$) e tratamento com L-DOPA/ Benserazida ($n=8$). Em A: as doses do peptídeo Fraternina-24 foram: 7,2 nmol ($n=6$), 3,6 nmol ($n=7$), 1,8 nmol ($n=6$). Em B: as doses do peptídeo Fraternina-14 foram: 6,4 nmol ($n=7$), 3,2 nmol ($n=9$), 0,6 nmol ($n=6$). Em C: as doses do peptídeo Fraternina-10 foram: 8,3 nmol ($n=7$), 4,1 nmol ($n=8$), 0,8 nmol ($n=8$). Tratamentos com diferenças significativas # ($p < 0,01$), em relação a 6-OHDA e * ($p < 0,05$) em relação ao grupo L-DOPA. 106
- 23 Imagem com marcação dos neurônios dopaminérgicos reativos a enzima TH. A: Grupo 6-OHDA (40ug/animal) do lado veículo e em B neurônios imunomarcados do lado lesado; C: Grupo L-DOPA (6mg/kg) com a imagem do lado veículo e em D do lado lesado; E: Grupo tratamento Fraternina-24 na dose de 7,2 nmol do lado veículo e em F do lado lesado. Neurônios dopaminérgicos da SN imunomarcadas em verde no aumento de 20X. 107
- 24 Efeitos dos peptídeos Fraternina-24, Fraternina-10 e Fraternina-14 nos fatores de inflamação no modelo murino da DP. As concentrações de (A) IL-1 β , (B) IL-6 e (C) TNF- α do encéfalo de todos os animais experimentais nas maiores doses foram testadas, $n=4-5$. Os dados são

- mostrados como média \pm SEM. # ($p < 0,05$) em relação ao grupo veículo e * ($p < 0,05$) em relação ao grupo 6-OHDA + Veículo). 109
- 25 Ensaio de hemólise de eritrócitos de sangue de camundongos (Swiss) machos causados pelos peptídeos Fraternina-24, Fraternina-14 e Fraternina-10. 110
- 26 Histograma demonstrando os efeitos de concentrações crescentes dos peptídeos sintéticos Fraternina-24 (10 a 1000 nmol) e Fraternina-10 (10 a 1000 nmol) na ligação de [3H]-L-Glutamato a seus receptores. Os dados são apresentados em porcentagem do controle como média \pm EPM de 3 experimentos em triplicata. 112

LISTA DE TABELAS

| | | |
|---|---|----|
| 1 | Substâncias utilizadas nos ensaios biológicos in vivo, assim como a descrição da solubilização e a forma de administração. | 59 |
| 2 | Detalhamento das doses utilizadas dos peptídeos Fraternina-24, Fraternina-14 e Fraternina-10. | 62 |
| 3 | Descrição dos grupos experimentais e os controles já realizados indicando a dose, o tratamento e o total de animais utilizados para cada grupo. | 63 |
| 4 | Duração do experimento e ensaios comportamentais ocorridos em cada dia com dos diferentes tratamentos. | 71 |
| 5 | Distribuição do volume de cada tubo utilizado no ensaio de ligação de [3H]-L-Glutamato. | 84 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------------|---|
| AchE | Acetilcolinesterase |
| AMPA | α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato |
| ANOVA | Análise de variância |
| Apaf-1 | Fator-1 ativador de protease apoptótica |
| APCs | Células dendríticas apresentadoras de antígenos |
| BHE | Barreira Hematoencefalica |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso Animal |
| CNPq | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| COMT | Catecol-O-metiltransferase |
| DE₅₀ | Dose efetiva que produz 50% do efeito máximo |
| DP | Doença de Parkinson |
| DT₅₀ | Dose tóxica para 50% dos indivíduos experimentais |
| EAATs | Transportadores de aminoácidos excitatórios |
| ERRO | Espécies reativas de oxigênio |
| GABA | Ácido gama-aminobutírico |
| GB | Gânglios da Base |
| Gln | Glutamina |
| GLP-1 | Peptídeo - 1 “ <i>glucagon-like</i> ” |
| Glu | Glutamato |
| GPe | Globo Pálido externo |
| GPI | Globo Pálido interno |
| Icv | Via de administração intracerebroventricular |
| iGluRs | Receptores ionotrópicos de glutamato |
| IL | Interleucina |
| Ip | Via de administração intraperitoneal |
| I-TASSER | <i>Iterative Threading Assembly Refinement</i> |
| KA | Cainato |
| L-DOPA | Levodopa |
| LPS | Lipopolissacarideo |

| | |
|--------------------------------|---|
| MALDI TOF/TOF | <i>Matriz-assisted laser desorption ionization time of flight</i> |
| MAO-B | Monoamina-oxidase B |
| mGluRs | Receptores metabotrópicos de glutamato |
| MS | Espectros de Massas |
| nAChR | Receptores nicotínicos para acetilcolina |
| NB | Núcleos da base |
| NM | Neuromelanina |
| NMDA | N-metil D-Aspartato |
| NTS | Núcleo Subtalâmico |
| N-a-syn | Nitrato de alfa-sinucleína |
| O²⁻ | Ânio superóxido |
| OH⁻ | Radical hidroxil |
| PAMPs | Padrões Associados a Patógenos |
| PE | Potencial Eletrostático |
| RFNT | Receptores dos fatores de necrose tumoral |
| RRP | Receptores de Reconhecimento de Padrões |
| Sc | Via de administração subcutânea |
| SNC | Região pars compacta |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| SNP | Sistema Nervoso Periférico |
| SNpr | <i>Substância nigra pars reticulada</i> |
| SNr | Região pars reticulata |
| SOD | Superóxido dismutase |
| TH | Tirosina hidroxilase |
| TLRs | Receptor <i>Toll-Like</i> |
| TNF-α | Fator de necrose tumoral α |
| 6-OHDA | 6-hidroxidopamina |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 | ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS FUNDAMENTAIS DA DOENÇA DA PARKINSON (DP) | 16 |
| 1.2 | NÚCLEOS DA BASE E O CONTROLE MOTOR: SUBSTRATOS NEUROFISIOLÓGICOS PARA A DP | 20 |
| 1.3 | ABORDAGENS FARMACOLÓGICAS PARA O TRATAMENTO DA DP | 24 |
| 1.4 | PROCESSOS NEUROINFLAMATÓRIOS ENVOLVIDOS NA DP | 28 |
| 1.5 | EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA | 34 |
| 1.6 | PEPTÍDEOS UTILIZADOS PARA O TRATAMENTO DA DP | 40 |
| 1.7 | O PEPTÍDEO FRATERNINA E SUA AÇÃO NEUROPROTETORA | 43 |
| 2. | OBJETIVOS | 45 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 45 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 45 |
| 3. | MATERIAL E MÉTODOS | 47 |
| 3.1 | DELINEAMENTO E SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS | 47 |
| 3.2 | CONFIRMAÇÃO DA ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS, SEQUÊNCIA E ALINHAMENTOS DOS PEPTÍDEOS | 49 |
| 3.3 | PREDIÇÃO DE ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DOS PEPTÍDEOS | 50 |
| 3.4 | FÁRMACOS UTILIZADOS | 52 |
| 3.5 | SUJEITOS EXPERIMENTAIS | 53 |
| 3.6 | GRUPOS EXPERIMENTAIS | 49 |
| 3.7 | MODELO MURINO DE INDUÇÃO DA DOENÇA DE PARKINSON POR 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA) E ADMINISTRAÇÃO POR VIA INTRACEREBROVENTRICULAR (i.c.v.) | 57 |
| 3.8 | ADMINISTRAÇÃO DOS PEPTÍDEOS | 61 |
| 3.9 | ENSAIOS COMPORTAMENTAIS | 62 |
| 3.9.1 | Avaliação da coordenação motora nos tempos de 48h, 72h, 96 horas após a lesão por 6-OHDA | 62 |
| 3.9.2 | Avaliação da coordenação motora no teste de permanência por | 63 |

| | | |
|---------------|---|-----------|
| | 6 horas após a lesão por 6-OHDA | |
| 3.9.3 | Avaliação da neurotoxicidade dos peptídeos | 64 |
| 3.9.4 | Comportamento rotatório após desafio com apomorfina | 65 |
| 3.9.5 | Perfusão e histologia | 65 |
| 3.9.6 | Verificação da correta posição da cânula guia | 66 |
| 3.10 | DETECÇÕES PELA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA | 63 |
| 3.10.1 | Avaliação viabilidade de neurônios reativos a tirosina hidroxilase | 67 |
| 3.10.2 | Análise por Microscopia de Epifluorescência | 68 |
| 3.11 | DOSAGEM DE CITOCINAS | 69 |
| 3.12 | ENSAIO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA | 71 |
| 3.12.1 | Atividade Hemolítica dos Peptídeos | 71 |
| 3.13 | NEUROQUÍMICA | 72 |
| 3.13.1 | Avaliação de interação com a neurotransmissão glutamatérgica | 71 |
| 3.13.2 | Gradiente Descontínuo de Sacarose (GDS) | 74 |
| 3.13.3 | Estudo da ligação de 3H-Glutamato em membranas cerebrocorticais | 75 |
| 3.14 | ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 78 |
| 4. | RESULTADOS | 80 |
| 4.1 | AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DAS TRÊS NOVAS SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS | 80 |
| 4.2 | PREDIÇÃO DE ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DOS PEPTÍDEOS | 81 |
| 4.2.1 | Modelagem da estrutura tridimensional dos peptídeos | 81 |
| 4.3 | AVALIAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS NO MODELO MURINO DA DP | 85 |
| 4.3.1 | Confirmação da Análise por Espectrometria de Massas | 85 |
| 4.3.2 | Efeito dos tratamentos no teste de coordenação motora (48h, 72h, 96 horas) após a lesão. | 85 |
| 4.3.3 | Efeito dos tratamentos no teste de permanência de 6 horas. | 88 |
| 4.4 | EFEITO DOS TRATAMENTOS NA AVALIAÇÃO DA NEUROTOXICIDADE DOS PEPTÍDEOS | 91 |
| 4.5 | EFEITO DOS TRATAMENTOS NO COMPORTAMENTO | |

| | | |
|-----|--|-----|
| | ROTATÓRIO APÓS DESAFIO COM APOMORFINA | 94 |
| 4.6 | AVALIAÇÃO DOS NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS VIÁVEIS NA REGIÃO DA SUBSTÂNCIA NEGRA | 97 |
| 4.7 | DOSAGEM DAS CITOCINAS IL-1B, IL-6 E TNF-A | 101 |
| 4.8 | ATIVIDADE HEMOLÍTICA | 103 |
| 4.9 | AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO | 104 |
| 5. | DISCUSSÃO | 107 |
| 6. | CONCLUSÕES | 134 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 136 |
| | ANEXOS | 153 |

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS FUNDAMENTAIS DA DOENÇA DA PARKINSON (DP)

A Doença de Parkinson (DP) é uma das afecções neurodegenerativas crônicas mais frequentes, sendo comumente conhecida como Mal de Parkinson e insolitamente descrita como Paralisia agitante. Esse último termo foi utilizado primeiramente pelo médico inglês James Parkinson em 1817 e, posteriormente, a doença foi renomeada por Jean Martin Charcot (1875) em homenagem ao seu descobridor (TEIVE, 1998).

Define-se com clareza que na DP ocorre a perda neuronal progressiva que se evidencia em uma parte específica do cérebro, a *pars compacta* da substância negra no mesencéfalo, e provoca perturbações no tônus, na postura e nos movimentos voluntários (RIZEK; KUMAR; JOG, 2016). Neste distúrbio, há uma degeneração de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, levando a uma redução da modulação da dopamina e, conseqüentemente, a alterações motoras (BRAAK; DEL TREDICI, 2010).

A DP, assim como outras doenças neurodegenerativas, não possui etiologia ou causa conhecida. A resultante deficiência de dopamina desencadeia uma disfunção da via nigroestriatal, sendo este o fator gerador responsável pela fisiopatologia da DP (FEARNLEY; LESS, 1991; POST; LIEBERMAN; MOSHAROV, 2018). Acredita-se que, em média, os sintomas da DP se manifestam, quando

aproximadamente 70% da liberação de dopamina desaparece, e nesse momento ocorre o surgimento de alguns sinais, como a rigidez muscular, o tremor em repouso e as alterações na postura e no equilíbrio (TEIVE, 2005; POEWE et al., 2017).

As hipóteses etiopatogênicas têm oscilado entre diversas correntes, mas, no entanto, culminam com uma causa multifatorial, ou seja, a combinação de diversos fatores, como por exemplo, a ação de neurotoxinas ambientais, a produção de radicais livres, anormalidades mitocondriais, o envelhecimento cerebral e a predisposição genética (GOBBI et al., 2006b; MAITI; MANNA; DUNBAR, 2017).

Embora as causas e os mecanismos envolvidos na degeneração ainda sejam desconhecidos, inúmeras evidências apontam para o envolvimento de processos neuroinflamatórios e da excitotoxicidade glutamatérgica, que leva a morte neuronal via apoptose e/ou necrose (NUZZO et al., 2013).

Por ser uma desordem multissistêmica, as manifestações clínicas iniciais da DP são prioritariamente motoras e consistem na combinação de quatro níveis de sinais da doença: tremor de repouso, rigidez, bradicinesia e a instabilidade postural (MAZZONI; SHABBOTT; CORTÉS, 2012; POEWE et al., 2017; SZATMARI et al., 2017). O tremor de repouso é o sinal mais visível na DP e é descrito como movimentos trêmulos que são desempenhados por qualquer membro do corpo ou parte deste quando o paciente está parado, como os membros superiores e inferiores, a mandíbula, a cabeça, o tronco ou os lábios. No âmbito dos membros, o sinal pode apresentar-se em duas formas: pronação e supinação do antebraço e extensão e flexão dos dedos (JANKOVIC, 2008; MAZZONI; SHABBOTT; CORTÉS, 2012). A rigidez é caracterizada pelo aumento da resistência em toda a amplitude do movimento em que o indivíduo adquire uma postura curvada. A bradicinesia é a desaceleração dos movimentos e por último, a instabilidade postural que é a

alteração no equilíbrio, surgindo em estágios mais tardios da doença. Acredita-se que para que esse último sinal se intensifique, regiões específicas do SNC como o córtex cerebral, o cerebelo e os núcleos da base já estejam comprometidos, pois estes atuam no controle postural. Outros sinais como acinesia e hipocinesia são denominados como universais e podem estar presentes no início da doença e referem-se ao retardo do início do movimento e ou falta deste, e a redução da amplitude do movimento, respectivamente (MAZZONI; SHABBOTT; CORTÉS, 2012).

Até o momento, não há um modelo padrão para um correto diagnóstico da DP, sendo os critérios baseados na combinação dos 4 sinais motores cardinais (ALBANESE, 2003). E, com o intuito de auxiliar a compreensão acerca dessa doença e identificar as características da progressão e dos seus estágios, uma escala de progressão da DP foi desenvolvida por Goulart e Pereira (2005), o qual é dividida em 5 estágios. No primeiro estágio, o indivíduo apresenta um comprometimento unilateral do corpo sem afetar as funções diárias e cotidianas do indivíduo. No segundo, ocorre uma implicação mais acentuada na parte motora, onde os tremores passam a apresentar-se bilateralmente, sem afetar o equilíbrio. Já no terceiro estágio, os sinais como a instabilidade postural aparecem, mas o indivíduo ainda permanece com independência, o que já não ocorre no quarto estágio, no qual gera para a pessoa acometida uma incapacidade grave, com sintomas como bradicinesia causada pela diminuição do neurotransmissor dopamina na região dos núcleos da base, levando a inibição dos movimentos no córtex cerebral. A partir deste momento, o indivíduo já apresenta um retardo ao iniciar os movimentos e a acinesia que pode gerar uma total incapacidade no quinto e último estágio.

Sinais não-motores também estão presentes nas pessoas que possuem a DP, e as suas manifestações distinguem-se, entre depressão, distúrbios autonômicos (NICARETTA; PEREIRA; PIMENTEL, 1998), disfunção cognitiva, distúrbio do sono e demência (GALHARDO; AMARAL; VIEIRA, 2009). Outros distúrbios, tais como problemas olfativos, constipação e problemas oculares, podem ocorrer no início da doença (SZATMARI et al., 2017).

Suplementar a evolução lenta e progressiva da DP, o que explica ser uma doença de diagnóstico tardio, está o crescimento no número de indivíduos em todo o mundo que passará de 4,6 milhões em 2005 para 8,7 milhões em 2030 (DORSEY et al., 2007). Atualmente, a incidência de pessoas com DP está entre 10 e 50 para cada 100.000 pessoas por ano, e sua prevalência varia entre 100 e 300 por 100.000 habitantes (ELBAZ et al., 2016). Estimativas apontam uma prevalência de casos de DP nos Estados Unidos que varia de 1,2% a 3,2 % e uma incidência anual em torno de 20 casos para cada 100.000 habitantes, dados muito semelhantes a estudos realizados no Brasil, em que a prevalência de é 3,3% (BARBOSA et al., 2006).

Diferenças são encontradas entre os sexos nas pessoas acometidas pela DP, em que a incidência e prevalência de casos é maior em indivíduos do sexo masculino do que em indivíduos do sexo feminino (TAYLOR; COOK; COUNSELL, 2007), provavelmente devido ao efeito protetor do estrogênio em mulheres. Dados em animais corroboram essa hipótese, uma vez que em alguns estudos foi descrito uma função neuroprotetora do estrogênio em modelos animais de DP induzidos por MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), o que tem sido relatado como uma alternativa para o tratamento e terapia para indivíduos do sexo masculino (LITIM; MORISSETTE; DI PAOLO, 2015).

1.2 NÚCLEOS DA BASE E O CONTROLE MOTOR: SUBSTRATOS NEUROFISIOLÓGICOS PARA A DP

Os núcleos da base (NB) formam um grupo de núcleos subcorticais interligados e situados na região do mesencéfalo. Esses grupos também são chamados de Gânglios da Base e podem ser divididos em Estriado que constituem juntamente o Núcleo Caudado e o Putâmen, o Globo Pálido o qual é dividido em externo (GPe) e o interno (GPi), o Núcleo Subtalâmico (NST) e a Substância Negra, composta pela região *pars compacta* (SNc) e pela região *pars reticulata* (SNr).

As informações responsáveis pelo controle dos movimentos são originadas no córtex e processadas nos NB, que por sua vez retornam para o córtex através do tálamo. Esse circuito controla a atividade motora por meio da regulação de impulsos neurais que facilitam sua atividade tônica, auxiliando o planejamento e a execução de movimentos sequenciados como, por exemplo, a marcha humana (BLESA et al., 2017; GOBBI et al., 2006a).

Como consequência, no circuito motor, a ação dos NB sobre as suas conexões alvo são geralmente inibitórias. Este circuito é estruturado por três principais sistemas de projeção neuronal com vias bioquimicamente e morfologicamente distintas chamadas de via direta, via indireta e hiperdireta, com ações opostas e responsáveis pela modulação e pelo refinamento do controle motor (GERTLER; CHAN; SURMEIER, 2008; QUIROGA-VARELA et al., 2013).

Todas as vias recebem impulsos excitatórios oriundos diretamente de áreas corticais que convergem para dois importantes núcleos, o GPi e a SNr. Este circuito inclui projeções excitatórias glutamatérgicas (Glu), a partir do córtex para o estriado

que em seguida envia projeções inibitórias GABAérgicas (ácido gama-aminobutírico; GABA) para o tálamo (MINK, 1996) (Figura 1).

A via direta expressa os receptores de dopamina do tipo D1 e é modulada por neurônios GABAérgicos oriundos do estriado e apresentam projeções monosinápticas, que se projetam para os núcleos GPi e SNr. A via indireta, expressa os receptores de dopamina do tipo D2 e é modulada por neurônios GABAérgicos estriatais e projeções polissinápticas que convergem para o GPi e SNr, porém, percorrendo um caminho mais longo ao passar por outros dois núcleos, o GPe e o NST (NAMBU et al., 1990). O NST recebe entradas somatotopicamente oriundas diretamente de áreas corticais motoras, como o córtex motor primário o córtex pré-motor. A velocidade de condução neural procedente da via córtico-NST-GPi/SNr também denominada como via hiperdireta torna-se mais rápida que nas vias direta e indireta (HAMMOND; BERGMAN; BROWN, 2007).

A segunda maior fonte de entrada para os NB surgem a partir de projeções excitatórias do córtex frontal para o NST. Sendo que a principal via de saída dos NB consiste em neurônios GABAérgicos que emergem do GPi e SNr, e inibe tonicamente as regiões do tálamo e tronco encefálico. Quando o circuito é ativado, agora pela via direta onde os neurônios que surgem do GPi inibem uma população específica de neurônios, isto resulta em uma desinibição e, conseqüentemente, efetivação do planejamento motor. E, por fim, com o acionamento da via indireta, os neurônios derivados do GPi, ativam a inibição e a efetivação do comportamento motor (NAMBU et al., 1990).

Na DP, ocorrem alterações na atividade das regiões do tálamo e do córtex motor, em que o aumento dos sinais excitatórios pela via hiperdireta e inibitórios pela via indireta, além da redução dos sinais inibitórios da via direta, resultam em uma

desinibição reduzida no tálamo e no córtex, ocasionando em alterações motoras como a acinesia. Portanto, a integração das vias direta, indireta e hiperdireta controlam dinamicamente a atividade do tálamo e do córtex para o refinamento e seleção do controle motor (NAMBU et al., 1997).

Neurônios que possuem altos níveis de dopamina são proeminentes nas regiões mesencefálicas, em especial na substância negra. Alguns dos axônios desses neurônios terminam no corpo estriado, que recebe também a entrada massiva de neurônios excitatórios advindos de áreas corticais e em especial dos núcleos do tálamo, onde participam do controle dos movimentos complexos (TAKAKUSAKI et al., 2004).

Portanto, a fisiopatologia de perturbações ocorridas nos NB, como ocorre nas desordens neurodegenerativas, podem ser elucidadas pelo aumento ou diminuição da inibição das regiões do tálamo e do córtex (NAMBU; TOKUNO; TAKADA, 2002). Como consequência, no circuito motor, a ação dos NB sobre as suas conexões alvos é geralmente inibitória e a partir daí, as vias diretas e indiretas com ações opostas são as responsáveis pela modulação e pelo refinamento do controle motor (TURNER; DESMURGET, 2010).

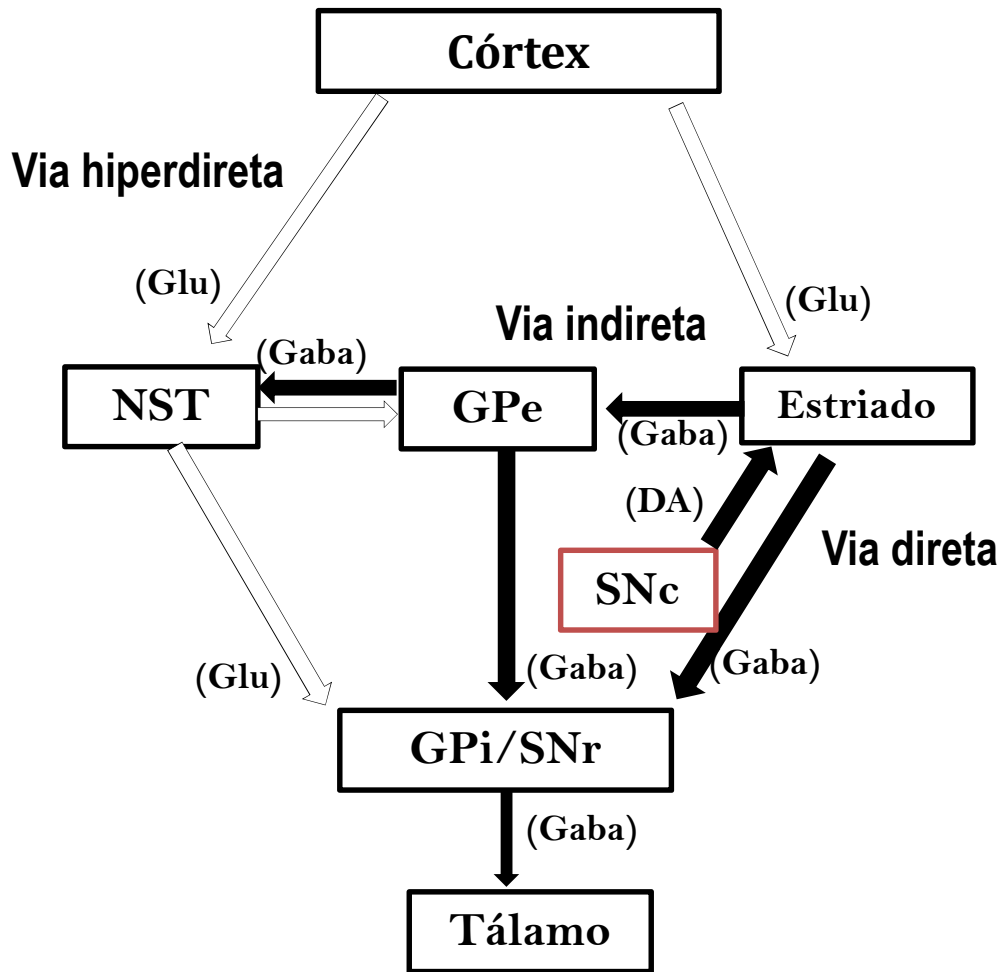


Figura 1: Diagrama esquemático demonstrando as vias hiperdireta composta pelos núcleos córtex-NST-GPi/SNr, pela via indireta representada pelos núcleos córtex-estriado-GPe-NST-GPi/SNr e pela via direta organizado em córtex-estriado-GPi/SNr e SNc. As setas brancas correspondem às projeções excitatórias glutamatérgicas (glu) e as setas pretas compreendem as projeções inibitórias GABAérgicas (GABA). Adaptado de Nambu et al. (2005).

1.3 ABORDAGENS FARMACOLÓGICAS PARA O TRATAMENTO DA DP

Atualmente, os principais fármacos utilizados para o tratamento da DP são: levodopa (L-DOPA); agonistas dopaminérgicos (pramipexol, ropinirol e bromocriptina) (DEVOS et al., 2013); inibidores da monoamina-oxidase B (MAO-B)

(selegilina e rasagilina) (CEREDA et al., 2017); os inibidores da acetilcolinesterase (AChE) (galantamina) (KUOPPAMÄKI; LEINONEN; POEWE, 2015) os antagonistas glutamatérgicos dos receptores NMDA (memantina e amantadina) (GONZALEZ et al., 2015); os fármacos Anticolinérgicos (benzatropina e Triexifenid) (CRISPO et al., 2016), e por fim, e mais recentemente um pró-fármaco precursor da norepinefrina, chamado de Droxidopa (HAUSER et al., 2016).

Apesar de ter sido descoberta há aproximadamente 50 anos, a L-DOPA continua sendo o tratamento de primeira linha utilizada em pacientes com a DP. E, para que ocorram os efeitos desejados, a L-DOPA necessita ser combinada com a carbidopa ou a benserazida que, além de diminuir os efeitos adversos periféricos, impede a sua degradação na parede do intestino delgado (RAY CHAUDHURI et al., 2016). A atuação desses inibidores acontece exclusivamente na periferia, pois não possuem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (AQUILONIUS; NYHOLM, 2017). Quando a L-DOPA chega ao SNC é rapidamente descarboxilada, apresentando uma meia vida plasmática extremamente curta com duração de cerca de duas horas (GOODMAN; GILMAN, 2005; ELLIS; FELL, 2017). Sabe-se que o efeito da L-DOPA pode depender do aumento na liberação de dopamina pelos neurônios dopaminérgicos remanescentes ou pela geração de um fluxo intenso de dopamina formada por sinapses oriunda de outros locais. O que se pode afirmar é que a eficácia terapêutica da L-DOPA diminui à medida que a doença avança e, conseqüentemente, com o seu uso em longo prazo, pode desencadear o aparecimento de complicações motoras graves como as discinesias, incluindo as oscilações de mobilidade decorrentes da deterioração de fim da dose chamado de “wearing-off”, como também os padrões de resposta a flutuações motoras conhecidas como fenômeno “on-off”, que não são identificados nos pacientes com a

DP não tratada (DONG et al., 2016). Esse último efeito parece estar ligado às flutuações na concentração plasmática de L-DOPA e tem sido envolvido na incapacidade dos neurônios em armazenar a dopamina, o que exige uma demanda contínua desse neurotransmissor (AHLISKOG; MUENTER, 2001; (VIJAYAKUMAR; JANKOVIC, 2016).

Estudos demonstram que ao se introduzir inicialmente outros fármacos como os agonistas dos receptores de dopamina D1/D2 como monoterapia, pode se adiar a utilização de L-DOPA, e, por conseguinte, retardar ou prevenir o desenvolvimento de complicações motoras (HUBBLE, 2002; BONUCCELLI; COLZI; DOTTO, 2002).

As terapias aprovadas para o tratamento da DP e que visam amplificar os efeitos da dopamina são apomorfina, bromocriptina, ropinirol, pramipexol e rotigotina. Os agonistas dopaminérgicos podem demonstrar efeitos antiparkinsonianos através de ações diretas sobre os receptores de dopamina D1 e D5 (D1-like) D2, D3 e D4 (D2-like) (MARSILI; MARCONI; COLOSIMO, 2017), juntamente com outros subtipos de múltiplos receptores cerebrais. Assim, a ativação de receptores dopaminérgicos que estão localizados em regiões diferentes daquelas afetadas na DP, como no GP, no NST, e nas regiões mesolímbicas e mesocorticais também podem contribuir para que ocorra a atividade dos agonistas seletivos (JENNER, 2002). Por exemplo, os agonistas dopaminérgicos pramipexol e ropinirol, seletivos para os receptores D2 e D3, respectivamente, são bem tolerados e não apresentam flutuações motoras quando associados a L-DOPA. Além disso, estudos realizados com pacientes tratados com os fármacos cabergolina, pramipexol e ropinirol mostraram uma redução no aparecimento de efeitos adversos, e uma menor tolerância quando comparado ao tratamento com L-DOPA (INZELBERG; SCHECHTMAN; NISIPEANU, 2003).

A outra classe importante para o tratamento da DP são os inibidores da MAO (monoamina oxidase) como, por exemplo, a L-deprenil (seleginina) (PERETZ et al., 2016). A MAO é uma enzima que substitui um radical amina por um oxigênio da dopamina, e conhecido por deaminação oxidativa e gera como produtos aldeídos e íon amônio, e age em substratos específicos.. A MAO-A se caracteriza por ter preferência pelo substrato 5-hidroxitriptamina (serotonina) e noradrenalina, normalmente é encontrada no sistema nervoso, fígado, trato gastrointestinal e na placenta. DA é metabolizada pela isoforma MAO-A e pela MAO-A/MAO-B em células gliais e astrócitos. Logo, a MAO-B localiza-se nas células sanguíneas e no SNC, localizadas principalmente nas células da glia (ANDRADE; FERRAZ, 1997). Em um estudo realizado por Cereda et al., (2017) de controle de caso observou-se que o uso prolongado de inibidores da MAO-B resultou em uma redução na variação da dose de levodopa administrados e uma menor frequência de discinesias em pacientes com a DP, efeito também apresentado com o tratamento utilizando antagonista dos receptores de NMDA (amantadina) (LUGINGER et al., 2000).

Os inibidores da MAO-B protegem a dopamina da degradação e foi inicialmente utilizada em conjunto com a L-DOPA. Estudos que consistiram em comparar os efeitos produzidos pelos inibidores enzimáticos catecol-O-metiltransferase (COMT) e a MAO-B quando administrados em conjunto com a L-DOPA produziram uma redução dos sinais em pacientes com DP em estágios avançados, entretanto, essa associação aumentou a ocorrência de efeitos adversos (ALSHAMMARI; ALMUTAIRI, 2015; TALATI et al., 2009). Os fármacos entacapona e tolcapona são classificados como inibidores da COMT que é uma enzima que catalisa a dopamina em 3-Metoxitiramina (3-MT), sendo oxidada pela MAO-B em HVA. De modo similar aos inibidores da MAO-B, os inibidores da COMT aumentam

os níveis de dopamina na fenda sináptica e reduzem os sinais motores (K; S; CE, 2009).

A galantamina, um inibidor da acetilcolinestese (AChE), utilizado inicialmente para o tratamento de demência, pode também aumentar a liberação de dopamina em terminais nigroestriatais. Esse efeito é causado provavelmente devido à ação do fármaco se ligando alostericamente em receptores nicotínicos para acetilcolina (nAChR) (INDEN et al., 2016).

Os anticolinérgicos são fármacos que não agem diretamente no sistema dopaminérgico, paralelamente, atuam como antagonistas dos receptores muscarínicos auxiliando na modulação da atividade da Ach, que está envolvida na regulação dos movimentos com benefícios relevantes sobre o tremor e a distonia em pacientes (ELLIS; FELL, 2017). Medicamentos anticolinérgicos como a benztropina e o triexifenid atuam como antagonistas dos receptores M4 dentre os 5 subtipos de receptores muscarínicos (M1-M5) (BETZ et al., 2007). Estes fármacos apresentam benefícios relevantes sobre o tremor e a distonia em pacientes, porém seu uso clínico é limitado devido aos fortes efeitos adversos apresentados (CRISPO et al., 2016). E, por fim, a Droxidopa, um pró-fármaco precursor da norepinefrina que foi recentemente aprovado nos EUA para o tratamento de hipotensão ortostática neurogênica sintomática, causada por falência autonômica primária a DP (HAUSER et al., 2016).

Considerando-se as limitações das principais formas de tratamento apresentadas anteriormente, surge um grande interesse e empenho no desenvolvimento de novas ferramentas farmacológicas capazes de atuar em diferentes vias de transmissão neural, visando não somente tratar os sinais da DP,

mas diminuir os efeitos colaterais medicamentosos e, em especial, atuar na redução da progressão da perda neural.

Para tanto, além das abordagens meramente sintomáticas descritas, várias estudos buscam investir em novas frentes terapêuticas como as abordagens neuroprotetora e a neurorestauradora. Essas novas abordagens terapêuticas consistem em desenvolver novos compostos que sejam capazes de alterar o curso da doença, evitando a morte dos neurônios remanescentes, assim chamado de neuroprotetora e/ou substituindo por novas células neurais, aqueles neurônios que estão danificados ou em processos apoptóticos, denominado de neurorestauradora (MANDEL et al., 2003; YODIM; GELDENHUYS; VAN DER SCHYF, 2007; YODIM et al., 2014).

1.4 PROCESSOS NEUROINFLAMATÓRIOS ENVOLVIDOS NA DP

A Inflamação é uma reação de defesa crucial inata dos seres vivos. Capaz de atuar contra diversos insultos com a função de limitar a proliferação de patógenos invasores, promover a sobrevivência do tecido, reparo e recuperação, e conservar a energia do organismo. É formada de uma grande variedade de mecanismos moleculares, celulares e de uma intrincada rede de controle, constituindo-se de uma resposta geralmente benéfica ao organismo. Entretanto, uma inflamação extensiva, prolongada ou não regulada pode ser altamente prejudicial (TAYLOR; MAIN; CRACK, 2013).

Por conseguinte, o carácter multifatorial da resposta inflamatória é caracterizado pela ocorrência de uma grande diversidade de mediadores pró e anti-inflamatórios, sendo que muitos destes são os responsáveis pela morte celular, enquanto outros podem limitar o avanço da inflamação ou exercer efeitos neurotróficos benéficos. Deste modo, não será um único mediador, mas um conjunto de agentes inflamatórios que determinarão a prevalência de efeitos deletérios ou benéficos durante a evolução neuroinflamatória (HIRSCH; VYAS; HUNOT, 2012).

No SNC, os processos inflamatórios podem ser iniciados pela detecção de agentes infecciosos pelo sistema imune inato e, posteriormente, pelo sistema imune adaptativo, pois, enquanto a imunidade inata não requer a presença de um antígeno específico para se desenvolver, a imunidade adaptativa é ativada quando um antígeno específico é identificado pelos linfócitos (WILMS et al., 2003; ZECCA et al., 2008).

A neurodegeneração pode advir por mecanismos inflamatórios crônicos ou agudos que envolvem a ativação de macrófagos residentes no encéfalo considerados como o elemento chave da resposta patológica, e denominado de células microgliais (DE VIRGILIO et al., 2016; PHANI; LOIKE; PRZEDBORSKI, 2012; TANSEY; GOLDBERG, 2010).

As células microgliais são células do sistema imune inato e estão dispersas por toda parte no SNC, em constante movimento, são responsáveis pelo estado funcional normal das sinapses e são capazes de detectar neurônios danificados e antígenos estranhos (KIM; VELLIS, 2005). Além dos macrófagos residentes no encéfalo, neutrófilos e macrófagos derivados de monócitos da corrente sanguínea podem induzir a neurodegeneração (TANSEY; GOLDBERG, 2010). No cérebro saudável, a micróglia residente exibe uma característica de repouso e destaca-se

por manter a vigilância e promover a homeostase (KREUTZBERG, 1996). Nas condições patológicas, como por exemplo, após uma lesão, acidente vascular encefálico, ou doenças neurodegenerativas com o acúmulo de proteínas alteradas a micróglia é ativada, iniciando uma resposta imune. No entanto, a persistência ou a falha na resolução dos estímulos inflamatórios levará a uma superprodução de fatores neurotóxicos que podem danificar os neurônios, os oligodendrócitos ou estruturas da matriz extracelular culminando em morte celular (BLOCK; ZECCA; HONG, 2007).

A ativação da cascata de sinalização pró-inflamatória pode ser iniciada por microorganismos invasores que apresentam na superfície ou no interior da célula moléculas e ou resíduos específicos que constituem os Padrões Associados a Patógenos (PAMPs) (KAWAI; AKIRA, 2010; TROUTMAN; BAZAN; PASARE, 2012). Os PAMPs interagem com uma diversidade de receptores denominados como Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRP), dentre os quais estão à família dos receptores TLRs (*Toll-Like-Receptor*) (TROUTMAN; BAZAN; PASARE, 2012). Até o momento foram identificados 10 subtipos de receptores TLRs em humanos e 12 em camundongos (BOTOS; SEGAL; DAVIES, 2011). Esses receptores são expressos por muitos tipos de células no SNC, incluindo as células de macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (DCs) (IRIBARREN et al., 2005).

No SNC, a ativação específica da imunidade inata é desencadeada através da ativação de receptores localizados na membrana celular, denominados de receptores *Toll-like* 4 (TLR4), o qual é responsável pela iniciação da resposta inflamatória culminando em neurodegeneração e, conseqüentemente, morte celular (ABBAS, 2003; LEHNARDT et al., 2003). No processo inflamatório ocorre a liberação de mediadores que podem ser derivados dos microorganismos invasores como o

lipopolissacarídeo (LPS), que é um constituinte da parede celular das bactérias gram-negativas, ou podem ser liberados pelas células lesadas como a histamina ou pelas células que participam no processo de inflamação como citocinas pró-inflamatórias e o TNF- α (GOLDSBY et al., 2003).

O receptor TLR4 funciona com um receptor de transdução de sinal para LPS presente na membrana celular. A ligação do LPS ao TLR4 envolve a participação de três outras proteínas: a proteína que se liga ao LPS denominada de LBP, a CD14 e a MD-2 que permanece acoplada ao receptor TLR4 (GOLDSBY et al., 2003). A sinalização LPS/TLR4 pode levar à ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e, conseqüentemente, à síntese de citocinas, como por exemplo, o TNF-alfa e as interleucinas-1, -6 e -8 (IL-1, IL-6 e IL-8) promovendo assim, respostas inflamatórias (GOLDSBY et al., 2003; CALDER, 2006).

Apesar dos receptores TLRs serem originalmente descritos como fatores importantes para desencadear a resposta imune inata na presença de patógenos, estudos recentes descrevem que estes receptores também estão presentes em células da glia e neurônios, e estão relacionadas à lesão tecidual e a degeneração de células no SNC (ARROYO et al., 2011). Alguns estudos sugerem que a infecção por agentes virais podem ser o fator inicial para uma resposta inflamatória capaz de gerar dano celular e perda neuronal em regiões específicas do SNC. Porém, a ativação microglial advinda previamente por infecções virais ainda não está muito bem esclarecida quando relacionada com a DP (WILMS et al., 2003; ZECCA et al., 2008).

Em adição à resposta imune inata, a resposta imune adaptativa é desempenhada por células totalmente especializadas, como os Linfócitos T, B e NK/T, células dendríticas ou apresentadoras de antígenos (APCs), e também por

moléculas solúveis por eles produzidas, como as citocinas, quimiocinas e os anticorpos (DELVES; ROITT, 2000). A imunidade adaptativa é ativada mediante estímulos da resposta imune inata por um longo período, sendo uma defesa especializada com alta diversidade de receptores de superfície celular. Isto faz com que ocorra um aumento na diversidade de reconhecimento e memória pelos linfócitos, proporcionando uma resposta altamente qualificada pelo organismo (CHIARINI et al., 2005).

Portanto, o processo inflamatório faz parte da imunidade do indivíduo e constitui uma resposta normal. Porém, uma resposta exagerada ou descontrolada do sistema imune pode levar a uma hiperexpressão de moléculas e contribuir para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas agudas e crônicas. O que pode incluir as doenças de Parkinson, Alzheimer, Esclerose Lateral Amiotrófica, Trauma cerebral e da medula espinhal e o Acidente Vascular Encefálico, das doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico e doença inflamatória intestinal (TROUTMAN; BAZAN; PASARE, 2012). Além das doenças caracterizadas pelo aumento dos níveis das moléculas pró-inflamatórias, levando a uma superexpressão dos receptores TLRs e, conseqüentemente, uma maior liberação de mediadores inflamatórios (WYSS-CORAY; MUCKE, 2002).

Outro mecanismo neuroinflamatório secundário utilizado para a ativação microglial é a produção da neuromelanina (NM) liberada pelos neurônios catecolaminérgicos. A neuromelanina é produzida pelo catabolismo das catecolaminas que pode ser detectado fora dos neurônios pelas células da glia. Na DP ocorre uma perda progressiva de NM produzida pelos neurônios dopaminérgicos da substância negra, estando associado com a microgliose devido à ausência de NM extracelular (ZHANG et al., 2011). Portanto, a neuromelanina desempenha uma

papel importante para ativação das células, estimulando, por conseguinte, a produção de mediadores pró-inflamatórios e a regulação da sinalização de vias por expressão gênica (WILMS et al., 2003; ZECCA et al., 2008).

Portanto, a resposta inflamatória no SNC envolve tanto o sistema imune inato quanto o sistema imune adaptativo com a finalidade de proporcionar um equilíbrio entre os efeitos benéficos e os prejudiciais ao organismo, porém, sob condições patogênicas como, por exemplo, na DP, a micróglia é rapidamente ativada o que contribui significativamente para a morte neuronal em regiões específicas do cérebro (GONZÁLEZ-SCARANO; BALTUCH, 1999).

Sabe-se atualmente que muitas doenças que atingem o SNC envolvem o processo inflamatório e esta pode ser a principal causa de perda celular, como ocorre na DP (LIU; GAO; HONG, 2003; MCGEER; MCGEER, 2004; SCHWAB; MCGEER., 2008; AWAD et al., 2017) (Figura 2). Como relatado anteriormente, essa patologia apresenta diferentes causas e consequências, porém há evidências de que o bloqueio da inflamação pode retardar o aparecimento ou reduzir os sinais da DP (AWAD et al., 2017; BENKLER; AGMON-LEVIN; SHOENFELD, 2009; LIU; GAO; HONG, 2003).

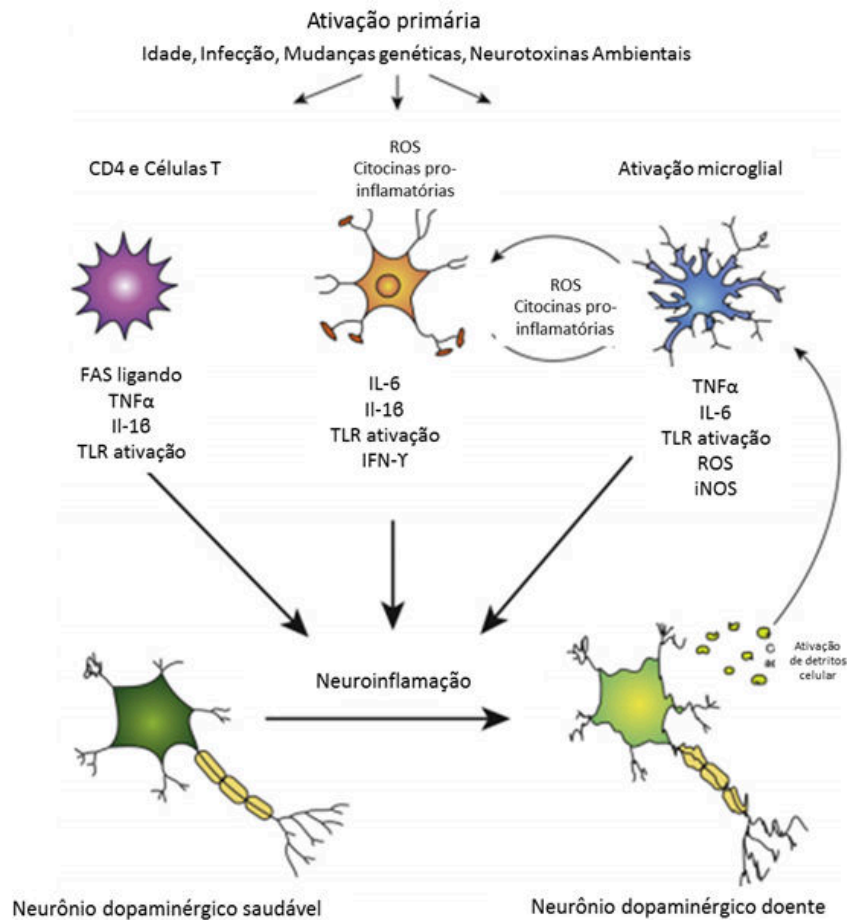


Figura 2: Figura ilustrativa dos principais mecanismos desencadeadores da resposta neuroinflamatória e oxidativa na DP. Diferentes vias de ativação primária como idade, exposição a neurotoxinas ambientais, lesão cerebral ou infecção e alterações genéticas podem convergir em uma interação complexa ocasionando a neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos mediante uma resposta neuroinflamatória. Adaptado de Taylor, Main e Crack (2013).

1.5 EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA

O sistema glutamatérgico possui um papel central na neurotransmissão excitatória, e está envolvido em quase todos os aspectos do desenvolvimento normal do cérebro. Alterações na regulação e na homeostase desse sistema geram processos danosos ao SNC (LIPTON; ROSENBERG, 1994).

O sistema glutamatérgico é composto pelo ácido glutâmico, principal neurotransmissor excitatório do SNC, e pelos seus receptores, que podem ser divididos em receptores ionotrópicos (iGluRs), Cainato (KA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA) e N-metil-D-aspartato (NMDA), associados a canais catiônicos seletivos e os receptores metabotrópicos (mGluRs 1-8) acoplados à proteína G que desempenham mecanismos de respostas intracelulares, através da ativação de segundos mensageiros (MARTÍNEZ-LOZADA; ORTEGA, 2015). Os receptores NMDA são organizados com sete tipos de subunidades (GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A, GluN3B), as subunidades que compreendem os receptores AMPA são quatro (GluA1-4) e para o cainato são cinco (GluK1-5) (JANE; LODGE; COLLINGRIDGE, 2009).

Os receptores mGluRs pertencem aos membros da classe C de receptores acoplados a proteína G e são divididos basicamente em 8 tipos diferentes de receptores homodiméricos (KIRISCHUK; KETTENMANN; VERKHRATSKY, 2007). Com base na sua homologia estrutural e atuação farmacológica, os receptores (mGluRs) podem ser divididos em 3 grandes grupos amplamente distribuídos pelo SNC. Os receptores mGlu do grupo 1 é composto de mGluR 1 e mGluR 5 e, estão, localizados em células pós-sinápticas com papel claramente excitatórios e elevação do Ca^{2+} intracelular, já os receptores mGluR do grupo 2 é composto de mGluR2 e mGluR3 e o grupo 3 é formado pelos mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR 8 e estão localizados na membrana das células pré-sinápticas com funções de inibição da adenilato-ciclase, participando portanto da atividade inibitória (MARTÍNEZ-LOZADA; ORTEGA, 2015). Devido à ação estimulatória pós-sináptica desempenhada pelos receptores mGlu do grupo 1, antagonistas que bloqueiam os sítios de modulação

alostérica dos receptores mGluRs apresentam grande potencial terapêutico para o tratamento de desordens neurodegenerativas (KEW, 2004).

O glutamato (L-glutamato) está amplamente distribuído e de forma bastante uniforme no SNC (REINER; ISACOFF, 2014). O glutamato é originado principalmente da glicose, por intermédio do ciclo de Krebs, ou da glutamina, o qual é sintetizada pelas células da glia e captada pelos neurônios. Logo, após a sua síntese, o glutamato é armazenado em vesículas sinápticas e liberado por exocitose dependente de Ca^{2+} . Proteínas transportadoras específicas respondem por sua recaptação dentro dos neurônios e por seu acúmulo em vesículas sinápticas. Logo após a sua liberação na fenda sináptica, o glutamato pode ser captado pelos neurônios por transportadores dependentes de Na^+ , H^+ e K^+ ou reciclado após a captação por astrócitos e conversão em glutamina (Gln), que através de transportadores específicos volta aos neurônios glutamatérgicos que convertem a glutamina em glutamato (SHIGERU; SEAL; SHIMAMOTO, 2004).

O glutamato liberado pela célula pré-sináptica ativa os seus receptores, e destes, os receptores ionotrópicos (iGluRs) do tipo NMDA e os receptores (mGluRs) do grupo I são os que parecem desempenhar um papel desencadeador na excitotoxicidade mediada por glutamato (ARUNDINE; TYMIANSKI, 2003; KEW, 2004).

Os receptores NMDA são encontrados com maior abundância nas regiões do córtex cerebral e núcleos da base e estão envolvidos em vários aspectos da fisiologia cerebral, como as funções cognitivas de aprendizagem e memória e apresenta um papel central na fisiopatogênese de doenças neurodegenerativas, uma vez que são altamente permeáveis ao Ca^{2+} (ARUNDINE; TYMIANSKI, 2003).

Para que ocorra a ativação dos receptores NMDA é necessária a coligação da glicina e do glutamato, cada um em seu próprio sítio, e ambos os sítios precisam estar ativados para que o canal abra, além do bloqueio do magnésio (Mg^{2+}) que só se desloca após uma prévia alteração da voltagem. Devido aos fatores descritos, os receptores NMDA e os seus canais associados desempenham um papel importante na ativação dos mecanismos fisiopatológicos, estando mais envolvidos, durante a excitação sináptica, no aumento citossólico de cálcio do que os outros tipos de receptores (SZYDLOWSKA; TYMIANSKI, 2010).

Em situações patológicas, ocorrem alterações nas células pós-sinápticas desencadeadas pelo acúmulo de concentrações excessivas de glutamato no espaço extracelular e a conseqüente entrada de íons Ca^{2+} pelos canais ligados aos receptores NMDA, culminando num processo conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica (LIPTON; ROSENBERG, 1994) (Figura 3).

Os níveis de glutamato também podem ser regulados por uma única família de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs), os quais possuem localizações distintas dispersas em todo o SNC, com características moleculares e farmacológicas distintas. Desta família, os transportadores EAAT1 e EAAT2 têm sido identificados em células gliais como os responsáveis pela captação de glutamato, e parecem ter funções especializadas em determinados tipos de sinapses. Alterações nos transportadores EAATs estão especificamente implicados na patologia de doenças neurodegenerativas, tais como esclerose lateral amiotrófica, epilepsia, doença de Huntington e a Doença de Alzheimer (BEART; O'SHEA, 2007).

Além da superexpressão de receptores de glutamato e a ativação de canais e transportadores ligados a este neurotransmissor, fator essencial na neurotoxicidade, outras alterações no funcionamento celular decorrentes de um excessivo influxo de

Ca^{2+} no neurônio são desencadeadas (POST; LIEBERMAN; MOSHAROV, 2018). Em regiões como na SN ocorre uma superexpressão de canais de cálcio Cav1.3 do subtipo L, aumentando os níveis de cálcio citossólico nos neurônios dopaminérgicos. Ocorre também a ativação de outros canais: como os Receptores de Potenciais Transientes Mutantes (TRPM2, TRPM7), os canais de cálcio dependentes de voltagem (CaVD) e os canais iônicos sensíveis a ácidos (ASICs), também podem induzir à excitotoxicidade e à morte celular (GUZMAN et al., 2010; SZYDLOWSKA; TYMIANSKI, 2010; SURMEIER et al., 2011).

Como consequência do excesso de Ca^{2+} , ocorre também à ativação de algumas famílias de enzimas, como a cinase-C e reguladas por calmodulinas, calpaínas e fosfolipases. Por sua vez, estas disparam uma gama de cascatas destrutivas, resultando na lesão da membrana celular denominada como necrose e, conseqüente, ativação da resposta inflamatória (RASOLA; BERNARDI, 2011), assim comona degradação de proteínas neuronais estruturais (LIPTON; ROSENBERG, 1994; SCHWAB; MCGEER., 2008).

Os mGluRs modulam a atividade neuronal tanto no SNC como no Sistema Nervoso Periférico (SNP), com sítios de modulação alostérica tanto inibitória quanto excitatória. Nesse contexto, vários análogos do aminoácido glutamato com função agonistas e antagonistas já foram avaliados com o intuito de investigar e compreender o funcionamento do SNC e patologias relacionados. No entanto, a utilidade desses compostos seletivos aos mGluRs como potenciais terapêuticos para o tratamento de desordens neurodegenerativas ainda não está disponível, devido a sua fraca biodisponibilidade e penetração pela Barreira Hematoencefálica (BHE) (KEW, 2004).

No entanto, outras alterações como na neurotransmissão glutamatérgica e na disfunção metabólica neuronal parecem desempenhar um papel central para a fisiopatologia da DP. O glutamato por sua vez, como um neurotransmissor excitatório, desempenha um papel central nesse processo ao atuar principalmente no Núcleo subtalâmico (NST). O que sobrevém da alta expressão de receptores para glutamato na membrana celular e consequente vulnerabilidade seletiva destes neurônios. Com o esgotamento dopaminérgico nigroestriatal, as projeções glutamatérgicas do NST para os núcleos de saída dos gânglios da base se tornam hiperativos e os receptores de glutamato nessas regiões alteram relevantemente (GREENAMYRE, 2001). Além disso, as alterações nas concentrações elevadas de glutamato no espaço extracelular acabam por induzir o dano neural e consequente perda celular em neurônios (MEHTA et al., 2013).

Sabe-se que no estriado ocorre um balanço totalmente coordenado entre a dopamina e o glutamato, visto que a depleção de dopamina pelo bloqueio dos receptores estriatais do tipo D, causam um aumento na liberação do glutamato juntamente com a regulação negativa dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, o que não ocorre para os receptores AMPA (BLANDINI; GREENAMYRE, 1998). Devido à relação estreita que liga a neurotransmissão dopaminérgica com a glutamatérgica, pode-se concluir que o glutamato está diretamente envolvido nas alterações funcionais dos circuitos dos núcleos da base (BLANDINI; GREENAMYRE, 1998).

Para tanto, um estudo demonstra por meio de modelos animais, que o bloqueio de receptores de glutamato melhora as manifestações motoras da DP, e, por conseguinte, o envolvimento do sistema glutamatérgico na patogênese e sintomatologia fornece novos potenciais alvos para intervenção terapêutica e

controle da progressão e morte neuronal (MASILAMONI et al., 2011). Este bloqueio pode ser produzido a partir de moléculas que se ligam aos receptores de glutamato no circuito dos gânglios basais e, até o momento, sugere-se o envolvimento tanto os receptores de glutamato ionotrópicos, como os metabotrópicos.

Além disso, estudos eletrofisiológicos têm demonstrado que a hiperativação da via indireta em neurônios das regiões do estriado e da SN desencadeiam a morte neuronal e o seu bloqueio pode impedir a degeneração nessas regiões (GÖTZ et al., 1997). Em particular, os antagonistas do receptor de NMDA, os quais se ligam seletivamente a subunidade NR2B, e os antagonistas dos receptores de glutamato do tipo metabotrópicos mGluR5 parecem ser promissores para esta abordagem (MARINO; VALENTI; CONN, 2003).

Portanto, o desenvolvimento de estimuladores (agonistas) e inibidores (antagonistas) de receptores para o glutamato pode ser interessante para o tratamento de alterações do SNC, nas quais os níveis extracelulares de glutamato possam estar anormais. Doenças neurológicas e neurodegenerativas com etiologias distintas compartilham a excitotoxicidade mediada por glutamato como uma via patológica comum com diferentes impactos para cada tipo de patologia (BUNCH; ERICHSEN; JENSEN, 2009).

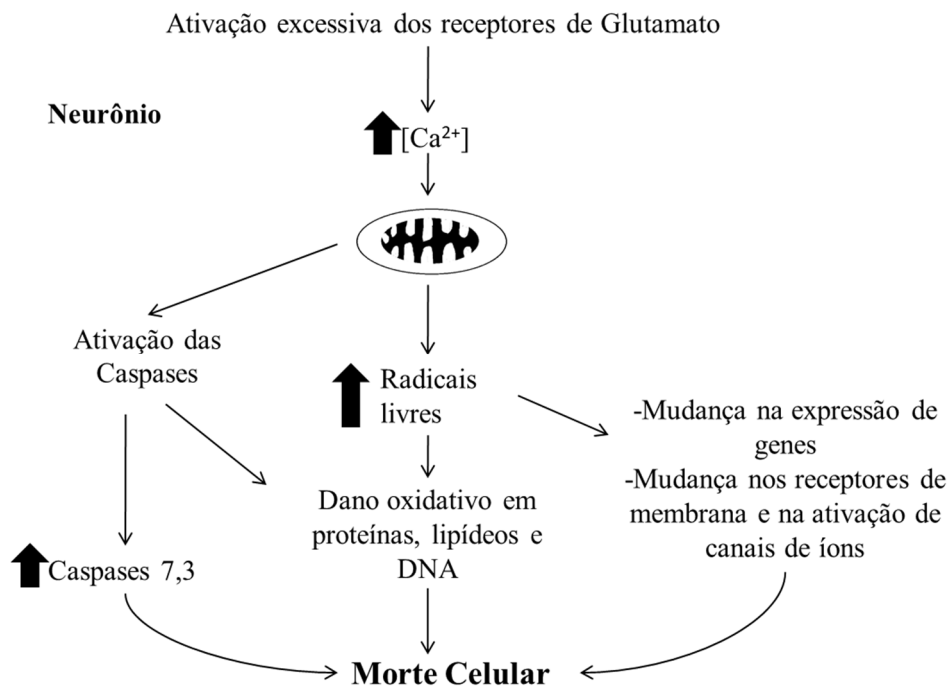


Figura 3: A ativação excessiva dos receptores de glutamato leva a uma disfunção mitocondrial causada por perturbações na homeostase do cálcio culminando na ativação das caspases, dano oxidativo, estresse oxidativo e morte celular. Adaptado de Bretón e Rodríguez (2012).

1.6 PEPTÍDEOS UTILIZADOS PARA O TRATAMENTO DA DP

Atualmente, os peptídeos e análogos têm sido utilizados como agentes terapêuticos para o tratamento de diversas condições patológicas. Além disso, muitos estudos têm sido conduzidos no sentido de identificar peptídeos de peçonhas animais com funções neuroprotetoras e /ou neuroresgatadoras, visando o tratamento de desordens neurodegenerativas (LEWIS; GARCIA, 2003).

Um composto que tem se mostrado promissor é o peptídeo exendina-4, cuja versão sintética foi chamada de Exanatide (Byetta®), concebido em 2005 para o tratamento da diabetes mellitus tipo 2, atualmente em estágios de pesquisa clínica

como potencial tratamento em pacientes portadores da DP (AVILES-OLMOS et al., 2013, 2014). Este composto foi isolado da saliva do lagarto *Heloderma suspectum* conhecido como monstro de Gila (ENG et al., 1992) e trata-se de um peptídeo de 39 resíduos de aminoácidos, que exibe propriedades semelhantes ao do peptídeo GPL-1 (“glucagon-like” peptídeo-1) (GÖKE et al., 1993). Os receptores alvos deste peptídeo têm sido identificados no SNC, e estudos em modelos animais demonstraram os efeitos benéficos após a administração do peptídeo Exenatida na aprendizagem e memória, além de ter demonstrado propriedades neuroprotetoras e restaurativas em pacientes com a DP (ATHAUDA et al., 2017; AVILES-OLMOS et al., 2015; CHEN et al., 2012; HARKAVYI et al., 2008).

Até o presente momento, entende-se que o peptídeo exenatide desempenha efeitos benéficos importantes sobre a homeostasia da glicose dependente da liberação de insulina, como também sobre a atividade de proliferação celular com efeitos na redução do peso corporal (BERTILSSON et al., 2008; FAN et al., 2010; PERRY et al., 2002). Mais precisamente, para o tratamento de desordens neurodegenerativas, alguns testes utilizando este composto em modelos pré-clínicos de neurodegeneração como também apresentou resultados positivos em pacientes com DP (AVILES-OLMOS et al., 2013b, 2015). Contudo, o mecanismo que desencadeia a ação neuroprotetora ainda é incerto. Estudos sugerem que a sua ação pode estar fundamentada em propriedades neurotróficas, anti-inflamatórias e neurogenéticas, ou estimulatórias da biogênese mitocondrial (BERTILSSON et al., 2008; FAN et al., 2010).

Além dos compostos extraídos de outras classes de animais, a peçonha bruta das abelhas e vespas são amplamente conhecidos por possuírem moléculas neuroativas com imenso potencial para o tratamento de doenças, como é o caso da

utilização da peçonha da abelha *Apis mellifera* (AWAD et al., 2017). A terapia com a peçonha bruta dessa abelha é utilizada há milhares de anos pela medicina tradicional chinesa ou coreana e consiste na injeção da peçonha de abelha ou vespa em pontos de acupuntura. Uma vez aplicados em locais específicos do corpo humano, pode trazer benefícios surpreendentes que buscam a cura de diversas doenças como em pacientes com a DP, dor e outras doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide e osteoartrite (CHO et al., 2017; LEE et al., 2016).

Em especial, para a DP, a peçonha bruta da abelha *Apis mellifera* e os seus componentes tem sido avaliados, uma vez que o mecanismo intensificador da degeneração é a inflamação por ativação microglial. Assim, a supressão deste fenômeno e, conseqüentemente, o efeito neuroprotetor já foram observados em estudos *in vitro* e *in vivo*, bem como em ensaios clínicos, onde a capacidade dessa peçonha foi capaz de interferir na progressão da DP, em uma escala de avaliação em pacientes com parkinsonianismo primário (CHO et al., 2012).

Para os testes *in vitro* realizados em cultura de células microgliais, a peçonha bruta de vespas reduziu a produção de NO, a COX-2, PGE2 e de citocinas pró-inflamatórias, como as IL-1 β , a IL-6 e o TNF- α (MOON et al., 2007). Em estudos com modelos animais, o efeito neuroprotetor tem sido comprovado pela utilização de compostos neurotóxicos capazes de provocar a depleção neuronal e os sintomas da DP. Como por exemplo, em um estudo realizado em animais, após a administração com o composto MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), e tratamento posterior com a peçonha de abelha, verificou-se uma proteção de células neuronais dopaminérgicas, pela diminuição da entrada de células do tipo CD4 e inativação microglial, suprimindo assim, a resposta neuroinflamatória (CHUNG et al., 2012). Em um mesmo modelo de depleção neuronal, verificou-se a capacidade da peçonha em

conjunto com a estimulação em pontos de acupuntura específicos no aumento dos níveis de dopamina no estriado, o que demonstra o grande potencial dos componentes da peçonha de vespas no tratamento para a DP (CHO et al., 2017).

Portanto, identificar os compostos presentes na peçonha dessas vespas, desenvolver uma via de administração que possa ser eficaz para o uso clínico em pacientes com a DP e conhecer os mecanismos de atuação destes compostos tornam-se imprescindíveis para a confirmação de novos potenciais fármacos para o tratamento e interrupção da progressão da doença.

1.7 O PEPTÍDEO FRATERNINA E SUA AÇÃO NEUROPROTETORA

A vespa *Parachartegus fraternus* apresenta comportamentos de eussocialidade e se dispersa amplamente em áreas de cerrado (RICHARDS, 1978; MATEUS, 2005). Quanto aos aspectos comportamentais, esta espécie apresenta grande agressividade ao atacar possíveis invasores por meio da aspensão de substâncias repelentes tanto no ninho como em aqueles que podem perturbar a sua colônia (MATEUS, 2005). Estes comportamentos têm sido bastante estudados, pois especificamente, esta espécie apresenta essa peculiaridade em relação as outras espécies de vespas. Sabe-se que em seu ninho não ocorre o crescimento bacteriano e nem a proliferação de fungos (DOS SANTOS et al., 2010), o que desperta ainda mais o interesse em caracterizar os compostos presentes em sua peçonha.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa isolou um composto extraído da peçonha da vespa *Parachartergus fraternus* com 24 resíduos de aminoácidos. Este composto trata-se de um peptídeo com 2748 Da, denominado de Fraternina. O peptídeo Fraternina, isolado diretamente da peçonha, apresenta um efeito neuroprotetor dose-dependente e foi capaz de evitar a degeneração de neurônios da via nigroestriatal, após a indução da DP pela administração da neurotoxina 6-OHDA em camundongos (BIOLCHI, 2014).

Logo, este peptídeo apresenta um alto potencial como fármaco-modelo no delineamento de compostos neuroprotetores para o tratamento de desordens neurodegenerativas.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito antiparkinsoniano e identificar os possíveis alvos farmacológicos de três compostos modificados a partir do peptídeo selvagem Fraternina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estabelecer três novas sequências peptídicas, a partir do composto selvagem Fraternina isolado da peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus*.
- ✓ Determinar a estrutura tridimensional dos peptídeos por meio do método Threading desenvolvido pelo servidor *I-Tasser* o pelo *Método de novo* realizado pelo servidor *QUARK*.
- ✓ Avaliar a atividade antiparkinsoniana dos três peptídeos sintéticos por meio da lesão estriatal dopaminérgica por 6-OHDA em camundongos, utilizando análise comportamental e imunohistoquímica.
- ✓ Avaliar o efeito na neurotransmissão glutamatérgica dos peptídeos sintéticos, utilizando técnicas de competição da ligação do neurotransmissor glutamato.
- ✓ Avaliar a neuroinflamação e o efeito dos peptídeos pela quantificação de mediadores inflamatórios no tecido cerebral.
- ✓ Avaliar os efeitos adversos dos peptídeos através do teste de desempenho motor (rotarod).

Material

e

Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO E SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS

Os três peptídeos foram sintetizados pela empresa WatsonBio Sciences pela estratégia Fmoc/t-butila em suporte sólido utilizando as resinas apropriadas com base na sequência do protótipo e purificadas por cromatografia líquida de alta resolução, utilizando coluna C18 de fase reversa.

O peptídeo selvagem identificado da peçonha da vespa *Parachatergus fraternus* continha ambiguidades relevantes que foram determinadas pelos métodos: esterificação de Fischer, que determina grupos funcionais ácidos na estrutura peptídica tanto nas cadeias laterais quanto no C-terminal; acetilação das lisinas, para diferenciar no sequenciamento por espectrometria de massa os resíduos de Lisina e Glutamina. E, como o peptídeo apresenta uma ligação de dissulfeto em sua estrutura foi necessário reduzir e alquilar as cisteínas com reagente iodoacetamida.

Após a confirmação de sequência peptídica o composto selvagem chamado de Fraternina (Biolchi 2013) teve como sequência final: Leu-Ser-Phe-Lys-Gln-Val-Lys-Glu-Lys-Val-Cys-Lys-Val-Ala-Glu-Lys-Leu-Gly-Lys-Lys-Leu-Pro-Phe-Cys-OH.

Desta forma, o desenho da primeira molécula sintética denominada de Fraternina-24 consistiu em duas modificações. A primeira modificação foi da inversão de dois resíduos de aminoácidos para Gln/Lys nas posições 4 e 5 permanecendo com 24 resíduos de aminoácidos e com uma ponte de dissulfeto, mantendo a mesma massa molecular do composto selvagem, de 2.748,50 Da. A

segunda modificação correspondeu na amidação da porção C-terminal da cadeia peptídica, tendo como sequência final: Leu-Ser-Phe-**Gln-Lys**-Val-Lys-Glu-Lys-Val-Cys-Lys-Val-Ala-Glu-Lys-Leu-Gly-Lys-Lys-Leu-Pro-Phe-Cys-**NH₂**.

A partir disso, o delineamento do segundo e do terceiro peptídeo consistiu na remoção de partes da sequência primária do peptídeo Fraternina-24, não apresentando modificações de resíduos de aminoácidos em sua sequência. Assim, o segundo peptídeo, denominado de Fraternina-14, é composto de 14 resíduos de aminoácidos, que corresponde à ponte de dissulfeto formada entre os dois resíduos cisteína (Cys). As modificações para este composto compreendeu na retirada dos 10 primeiros resíduos de aminoácidos conservando a amidação da porção C-terminal da cadeia peptídica. A sequência final do peptídeo cíclico Fraternina-14 foi: Cys-Lys-Val-Ala-Glu-Lys-Leu-Gly-Lys-Lys-Leu-Pro-Phe-Cys-NH₂, com a massa molecular de 1.583,50 Da.

O terceiro peptídeo foi denominado de Fraternina-10, por ser formado pelos 10 primeiros resíduos de aminoácidos (Leu-Ser-Phe-Gln-Lys-Val-Lys-Glu-Lys-Val NH₂), com massa molecular de 1204,49 Da. O peptídeo Fraternina-10 foi desenhado integrando os 10 primeiros aminoácidos, as modificações visaram tornar o peptídeo menor com a retirada dos aminoácidos a partir da Cys na posição 11 e na conservação da amidação da porção C-terminal da cadeia peptídica (Figura 4).

Desse modo, a proposta da modificação dos compostos estudados é o de se desenvolver um fármaco menor a partir de modificações do peptídeo selvagem modelo, capaz de produzir também respostas antiparkinsonianas, com efeitos neuroprotetoras contra a degeneração neuronal e com redução com efeitos adversos.

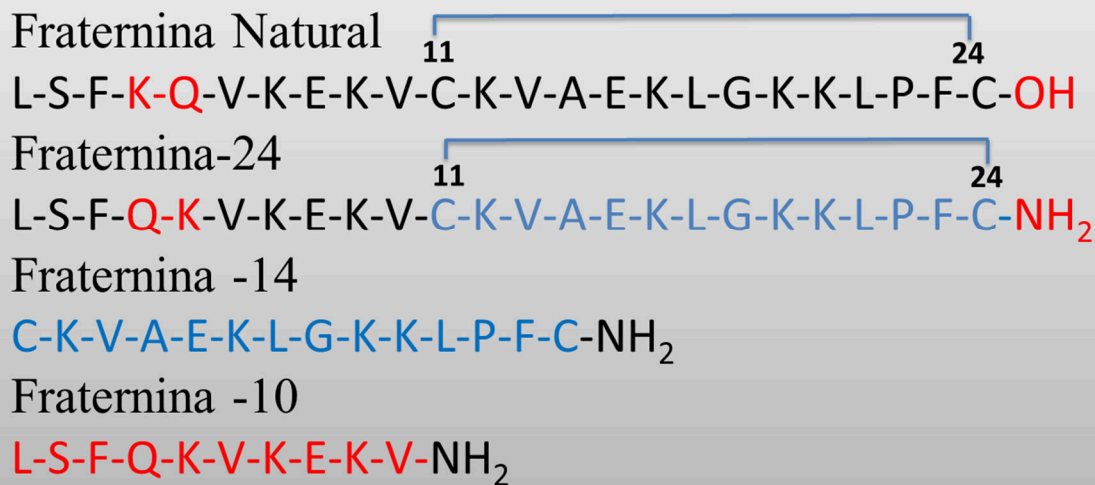


Figura 4: Representação esquemática do peptídeo selvagem Fraternalina e das alterações realizadas para os peptídeos sintéticos. As mudanças consistiram na alteração dos aminoácidos Lys/Gln e na amidação da região C-terminal para o peptídeo Fraternalina-24 e na redução dos 10 primeiros resíduos de aminoácidos com a permanência da ponte dissulfeto para o peptídeo Fraternalina-14. A retirada da ponte dissulfeto entre os aminoácidos 11 e 24 e redução deste em 14 resíduos de aminoácidos foi realizada para o peptídeo Fraternalina-10.

3.2 CONFIRMAÇÃO DA ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS, SEQUÊNCIA E ALINHAMENTOS DOS PEPTÍDEOS

Para a correta certificação da sequência de ambos os peptídeos sintetizados foram realizadas análises por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Time of Flight*) Autoflex speed (Bruker Daltonics®, Alemanha) pela empresa responsável pela síntese, imediatamente após sua entrega e a cada 3 meses. Para a confirmação das massas moleculares de ambos os compostos, os espectros de Massas (MS) foram obtidos em modo de operação refletido positivo e para a obtenção das sequências, espectros MS/MS, foram

utilizados no método LIFT. Posteriormente, as amostras foram devidamente ressuspendidas, aliquotadas e agregadas a uma matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma Aldrich®). A mistura foi aplicada, em duplicata, a uma placa MTP Achorchip 384 (Bruker Alemanha®) e após o tempo determinado para a secagem e a cristalização, as amostras foram avaliadas e detectadas a uma faixa de razão massa/carga (m/z) de 100 a 10.000 Da. Para a interpretação dos espectros obtidos foi utilizado o software: FlexControl 3.4 (Bruker Daltonics®, Alemanha) e para o sequenciamento *de novo* foi utilizado o software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics®, Alemanha).

A fim de confirmar a singularidade das sequências peptídicas, buscas por similaridades com outros peptídeos já isolados da peçonha de Himenópteros foram realizadas e comparadas no banco de dados BLASTP (disponível em <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>>). Depois de verificadas as similaridades realizou-se o alinhamento dos peptídeos, utilizando-se o programa Clustal Omega (disponível em <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>>).

3.3 PREDIÇÃO DE ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DOS PEPTÍDEOS

Há inúmeros métodos de modelagem molecular apropriados para o planejamento de fármacos. Para as proteínas, os métodos que permitem a realização da predição de estrutura são organizados basicamente em dois principais grupos: o método que utiliza estruturas de funcionam como um molde, que incluem os métodos por modelagem comparativa e *threading*; e o grupo de predição por

modelagem independente de estruturas molde, os quais incluem métodos *de novo* e *ab initio*. A construção dos modelos dos peptídeos foi realizada por meio do servidor I-Tasser (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) (DONG et al., 2016). Este servidor realiza uma abordagem hierárquica para construção da estrutura proteica e predição estrutural, primeiramente identificando modelos estruturais do PDB (Protein Data Bank) por meio da abordagem de encadeamento múltiplo LOMETS, construídos por simulações de montagem de modelos de fragmentos iterativos. O servidor I-Tasser foi classificado e reconhecido como o servidor número 1 para predição de estruturas proteicas e, além disso, fornece as previsões estruturais e funcionais mais precisas usando algoritmos de última geração.

O segundo modelo foi gerado por meio do servidor QUARK Online (*Ab Initio* Protein Structure Prediction) (XU; ZHANG, 2012). QUARK é um algoritmo computacional para predição de estrutura e dobramento proteico *ab initio*, que visa construir um modelo tridimensional correto somente a partir da sequência de aminoácidos. As estruturas obtidas são construídas a partir de fragmentos pequenos (1-20 resíduos de aminoácidos) por meio de simulações de Monte Carlo guiadas por um campo de força baseada no conhecimento em nível atômico.

As superfícies de potencial eletrostático foram calculadas usando o Programa de Gráficos Moleculares CCP4 (MCNICHOLAS et al., 2011), pelo método interno de Poisson-Boltzmann.

3.4 FÁRMACOS UTILIZADOS

Para melhor entendimento das substâncias utilizadas durante todos os procedimentos, segue uma tabela contendo os principais reagentes e a solubilização (Tabela 1):

Tabela 1: Substâncias utilizadas nos ensaios biológicos *in vivo*, assim como a descrição da solubilização e a forma de administração.

| SUBSTÂNCIA | SOLUBILIZAÇÃO | FORMA DE ADMINISTRAÇÃO |
|---|--|---------------------------------|
| 6- hidroxidopamina hydrochloride (6-OHDA) (Sigma-Aldrich®) | água e ácido ascórbico 0,2% | Intraestriatal |
| L-DOPA-(phenyl-d3) (L-DOPA) (Sigma-Aldrich®) | Solução salina (150 mM NaCl) e DMSO á 2% | Intraperitoneal (<i>i.p.</i>) |
| Cloridrato de benserazida (BEZ)) (Sigma-Aldrich®) | Solução salina | <i>i.p.</i> |
| Quetamina (Dopalen, Ceva® 75 mg/kg) | Solução salina | <i>i.p.</i> |
| Xilasina (Anasedan, Ceva®, 15 mg/kg) | Solução salina | <i>i.p.</i> |
| Cloridrato de lidocaína com hemitartrato de norepinefrina (Lidostesim, Densply®) | - | Subcutâneo (<i>s.c.</i>) |
| Tiopental sódico 120 mg/Kg | Solução salina | <i>i.p.</i> |
| Apomorfina 5µg/animal | Solução salina | <i>s.c.</i> |

3.5 SUJEITOS EXPERIMENTAIS

Após a obtenção da licença para a utilização dos componentes presentes na peçonha de animais da Biodiversidade Brasileira com a finalidade de pesquisa científica aprovada pelo CNPq (Autorização de Acesso e de Remessa de

Componente do Patrimônio Genético, Processo nº 010476/2013-0, Anexo 9), assim como da aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal da UnB (CEUA/UnB), aprovado e homologado sob número de protocolo UnBDoc 79100/2014 (Anexo 1) deu-se o início dos procedimentos experimentais.

Os animais escolhidos para a pesquisa foram camundongos machos Swiss (*Mus musculus*) com 5 a 7 semanas de vida e peso de 25 a 30g, e ratos Wistar pesando de 200 a 250g. Os animais foram mantidos em condições controladas de luz (ciclo de 12 horas de claro/escuro) com a temperatura de 25° C e a umidade de 55%, recebendo água e ração *ad libitum*. Todas as manipulações foram realizadas durante a fase de luz do dia. Os animais foram adquiridos do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UnB.

Os procedimentos deste estudo foram conduzidos de acordo com as leis brasileiras, assim como as diretrizes e os Princípios Éticos na Experimentação Animal (Brasil, 2009).

3.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais aptos aos protocolos experimentais, foram divididos em 10 grupos (N=6-8 animais) (Tabela 2).

- Grupo controle negativo ou chamado de grupo 6-OHDA: são aqueles em que os animais receberam a injeção de 6-OHDA (40 µg/animal, solubilizada em veículo (água e ácido ascórbico 0,2%) e foram tratados com salina (150mM) por via i.c.v.

- O grupo Veículo: neste grupo os animais receberam veículo (água e ácido ascórbico 0,2%), e foram tratados por via *i.c.v* com salina (250 mM).
- Grupo *Naive*: neste grupo os animais não receberam nenhum tratamento e não passaram por procedimento experimental.
- O grupo controle positivo ou grupo L-DOPA: os animais deste grupo receberam a injeção da 6-OHDA (40 ug/animal, solubilizada em veículo: água e ácido ascórbico 0,2%) e foram tratados com LevoDOPA (L-DOPA) e cloridrato de benserazida (BEZ), nas doses de 6 e 5mg/kg, respectivamente.
- O grupo tratado com o peptídeo Fraternina-24 ou Grupo Fraternina-24: nesse grupo os animais receberam a injeção da 6-OHDA (40 ug/animal, solubilizada em veículo: água e ácido ascórbico 0,2%) e foram tratados com diferentes doses do peptídeo Fraternina-24. As doses utilizadas foram 7,2, 3,6 e 1,8 nmol e foram administrados por via *i.c.v.* em 1 µl e diluídos em água deionizada.
- Grupo de toxicidade 1: este grupo foi determinado para a avaliação dos efeitos adversos: os animais receberam o veículo (solução de água e ácido ascórbico 0,2%) na região do estriado e o peptídeo Fraternina-24 (7,2, 3,6 e 1,8 nmol) na região do ventrículo por meio da cânula guia.
- O grupo tratado com o peptídeo Fraternina-14 ou Grupo Fraternina-14: nesse grupo os animais receberam a injeção da 6-OHDA (40 ug/animal, solubilizada em veículo: água e ácido ascórbico 0,2%) e foram tratados com diferentes doses do peptídeo Fraternina-14. As doses utilizadas foram 0,6, 3,2 e 6,4 nmol e foram administrados por via *i.c.v.* em 1 µl e diluídos em água deionizada.

- Grupo de toxicidade 2: este grupo foi determinado para a avaliação dos efeitos adversos: os animais receberam o veículo (solução de água e ácido ascórbico 0,2%) na região do estriado e o peptídeo Fraternalina-14 (0,6, 3,2 e 6,4 nmol) na região do ventrículo por meio da cânula guia.
- O grupo tratado com o peptídeo Fraternalina-10 ou Grupo Fraternalina-10: nesse grupo os animais receberam a injeção da 6-OHDA (40 ug/animal, solubilizada em veículo: água e ácido ascórbico 0,2%) e foram tratados com diferentes doses do peptídeo Fraternalina-10. As doses utilizadas foram 0,8, 4,1, 8,3 nmol e foram administrados por via *i.c.v.* em 1 µl e diluídos em água deionizada.
- Grupo de toxicidade 3: este grupo foi determinado para a avaliação dos efeitos adversos: os animais receberam o veículo (solução de água e ácido ascórbico 0,2%) na região do estriado e o peptídeo Fraternalina-10 (0,8, 4,1, 8,3 nmol) na região do ventrículo por meio da cânula guia.

Tabela 2: Detalhamento das doses utilizadas dos peptídeos Fraternalina-24, Fraternalina-14 e Fraternalina-10.

| Dose | Fraternalina-24 | Fraternalina-14 | Fraternalina -10 |
|----------|-----------------|-----------------|------------------|
| 1 µg/µl | - | 0,6 nmol | 0,8 nmol |
| 5 µg/µl | 1,8 nmol | 3,2 nmol | 4,1 nmol |
| 10 µg/µl | 3,6 nmol | 6,4 nmol | 8,3 nmol |
| 20 µg/µl | 7,2 nmol | - | - |

Tabela 3: Descrição dos grupos experimentais e os controles já realizados indicando a dose, o tratamento e o total de animais utilizados para cada grupo.

| Grupos experimentais | Fármaco / Tratamento | | Número de animais (n) |
|----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| | Estriado | Tratamentos | |
| Grupo 6-OHDA | 6-OHDA | salina/ i.c.v. | 8 |
| Grupo Veículo | Veículo (água e Ácido ascórbico 0,2%) | salina/ i.c.v. | 8 |
| Grupo controle positivo (L-Dopa) | 6-OHDA | L-Dopa/benzerazida por via i.p. | 8 |
| Grupo Fraternina-24 | | | |
| 1,8 nmol | 6-OHDA | Fraternina-24 / i.c.v. | 8 |
| 3,6 nmol | | | 9 |
| 7,2 nmol | | | 8 |
| Grupo Toxicidade 1 | | | |
| 1,8 nmol | Veículo | Fraternina-24 / i.c.v. | 8 |
| 3,6 nmol | | | 8 |
| 7,2 nmol | | | 8 |
| Grupo Fraternina-14 | | | |
| 0,6 nmol | 6-OHDA | Fraternina-14 / i.c.v. | 8 |
| 3,2 nmol | | | 6 |
| 6,4 nmol | | | |
| Grupo Toxicidade 2 | | | |
| 0,6 nmol | Veículo | Fraternina-14 / i.c.v. | 8 |
| 3,2 nmol | | | 8 |
| 6,4 nmol | | | 8 |
| Grupo Fraternina -10 | | | |
| 0,8 nmol | 6-OHDA | Fraternina-10 / i.c.v. | |
| 4,1 nmol | | | |
| 8,3 nmol | | | |
| Grupo Toxicidade 3 | | | |
| 0,8 nmol | Veículo | Fraternina-10 / i.c.v. | 8 |
| 4,1 nmol | | | 8 |
| 8,3 nmol | | | 8 |

3.7 MODELO MURINO DE INDUÇÃO DA DOENÇA DE PARKINSON POR 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA) E ADMINISTRAÇÃO POR VIA INTRACEREBROVENTRICULAR (I.C.V.)

A investigação da eficácia terapêutica *in vivo* foi conduzida em modelo murino para a DP pelo emprego do composto neurotóxico 6-hidroxidopamina (6-OHDA) intraestriatal em camundongos, conforme a descrição a seguir (adaptado de Alvarez-Fischer et al., 2008; Da Conceição et al., 2010).

Para a realização do procedimento, primeiramente os camundongos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de Quetamina (Dopalen, Ceva®, 75 mg/kg, intraperitoneal – ip) e Xilasina (Anasedan, Ceva®, 15 mg/kg, ip) e após verificar a sua insensibilização a estímulos nociceptivos, os animais foram colocados em um aparelho estereotático para o início do procedimento cirúrgico. Após a fixação do animal no estereotático, foi realizada a assepsia com iodopovidona (Vic Pharma®) e a tricotomia que foi realizada com o auxílio de uma tesoura, e logo após, foi administrado um anestésico local, cloridrato de lidocaína com hemitartrato de norepinefrina (Lidostesim, Densply®, subcutâneo - sc), e seguiu-se a remoção da pele para a exposição do crânio do animal (Figura 5-A). Em seguida, foram realizadas as medidas estereotáticas necessárias para o correto posicionamento da agulha para a injeção de 6-OHDA ou veículo na área do *striatum* esquerdo, de acordo com as seguintes coordenadas estereotáticas em relação ao ponto do Bregma: 0 mm (antero-posterior), + 2,5 mm (meso-lateral) e – 3,5 mm (dorso-ventral) (Franklin e Paxinos 1997) (Figura 7). Após a identificação e perfuração com uma broca dentária (Dremel®), os animais receberam uma injeção de 4 µL de 6-OHDA (Sigma®, Brasil, 40 µg/animal da base livre) ou veículo (água e ácido ascórbico 0,2%), intraestriatal esquerdo (Figura 5-B e Figura 6). Um sistema de

infusão foi utilizado para gerar uma taxa constante de injeção de 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ para cada administração da substância neurotóxica. Esse sistema consistiu em um tubo de polietileno (PE10, WPI®) acoplado a uma seringa de precisão (Hamilton®) de 10 μL com o auxílio de uma bomba de infusão (Insight®, Brasil).

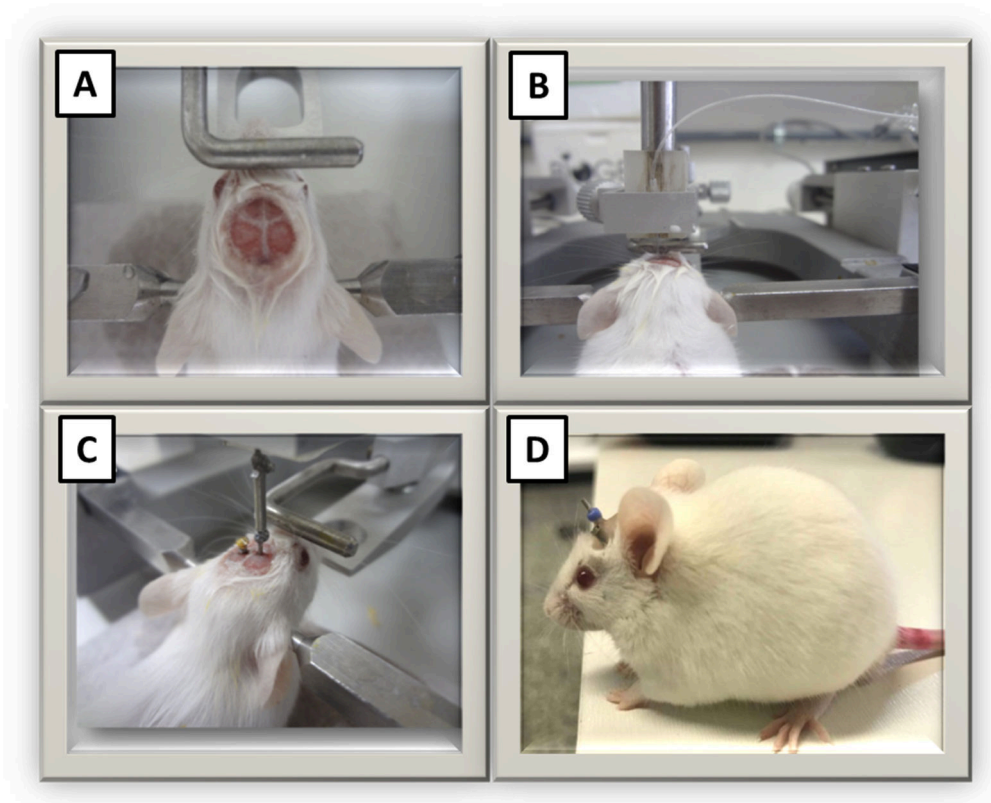


Figura 5: Procedimento neurocirúrgico. Em A: exposição do crânio e da linha do bregma. B: Lesão estriatal dopaminérgica com infusão de 40 $\mu\text{g}/4\mu\text{L}$ de 6-OHDA diretamente no Estriado esquerdo utilizando uma bomba de infusão com um fio de polietileno acoplado a uma seringa Hamilton de 10 μL . Em C: procedimento de implantação da cânula guia (10mm) e do parafuso na região do ventrículo lateral direito. Em D: animal após a recuperação dos procedimentos neurocirúrgicos. Todos os procedimentos seguirão as coordenadas estereotáxicas (em mm) em relação ao Bregma.

Durante a mesma neurocirurgia, na região contralateral à infusão da 6-OHDA ou veículo foi realizada a implantação de uma cânula guia (10 mm de comprimento; 0,76 mm largura) no ventrículo lateral cerebral direito para a administração dos compostos em teste. Para a realização deste procedimento, seguiu-se as especificações para a implantação da cânula-guia na área desejada, utilizando as

coordenadas estereotáticas em relação ao Bregma de +0,2 mm (antero-posterior), +1,0 mm (meso-lateral), -2,3 mm (dorso-ventral) (PAXINOS; FRANKLIN, 2004) (Figura 5-C e Figura 6).

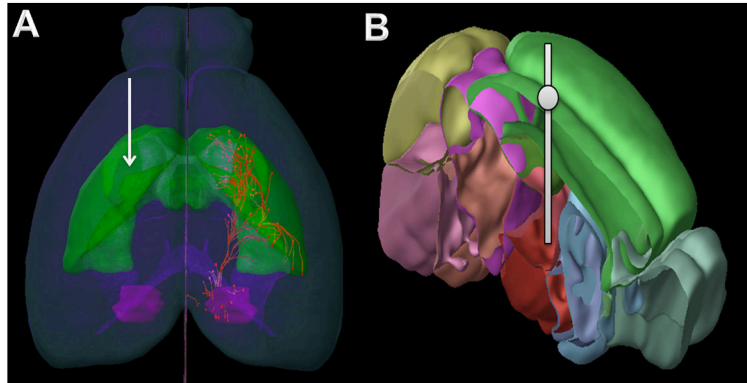


Figura 6: Imagem digital do cérebro de camundongo, indicando a região de inserção da agulha de injeção com a substância neurotóxica 6-OHDA na região do Estriado esquerdo em A. E em B, posição de inserção da cânula guia infundida na região do ventrículo lateral direito para o direcionamento e correta administração dos compostos em estudo. Imagem: Allen Mouse Brain Atlas (Gabriel Avohay).

Após a infusão do composto neurotóxico e da implantação da cânula guia foi adicionado um parafuso no mesmo orifício utilizado para a infusão da 6-OHDA, ou seja, na área contralateral à cânula-guia. Este parafuso tem como principais funções auxiliar na permanência do revestimento craniano realizado com o acrílico dental autopolimerizante e para contrabalancear a cânula-guia mantendo o equilíbrio do animal (Figura 7).

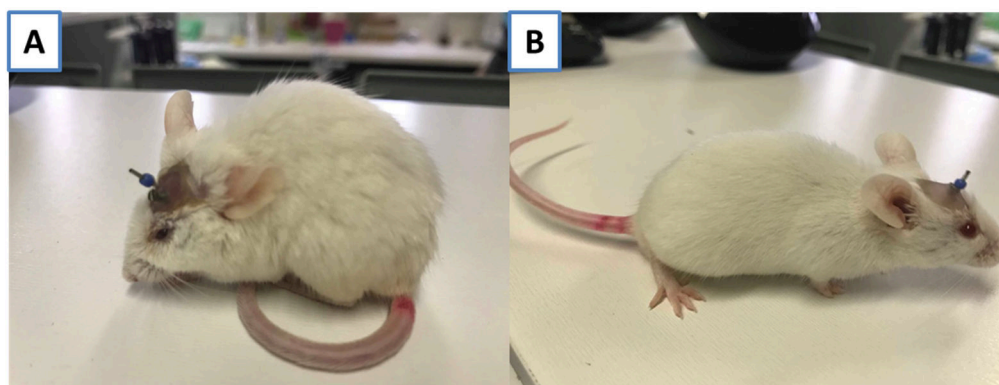


Figura 7: Imagem representativa dos animais lesionados por 6-OHDA e dos animais que receberam o veículo na região do estriado. Em A, animal doente apresentando alterações de rigidez, instabilidade postural e emagrecimento. Em B, animal pertencente ao grupo controle veículo, com a infusão do veículo (ácido ascórbico 0,2%) apresentando comportamento exploratório e com conservado peso corpóreo. Foto: Andreia Biolchi Mayer.

Ao término do procedimento, os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob as mesmas condições anteriormente relatadas. Após a recuperação da anestesia e durante todo o protocolo experimental, os animais receberam soro glicosado 5% (Equipex®) por via i.p, além de água e ração pastosa por via oral, a fim de garantir a sobrevivência dos mais enfraquecidos (Figura 7-A).

Para a realização dos procedimentos experimentais, foram injetadas as doses dos compostos que foram testados ou do veículo, por meio de uma agulha de injeção (10,2 mm) direcionada pela cânula-guia e acoplada a uma seringa de precisão (Hamilton®) com o auxílio de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus®), no volume final de 1 μ L/animal na velocidade 1 μ L/min.

3.8 ADMINISTRAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Os peptídeos Fraternina-24, Fraternina-14 e Fraternina-10 e os grupos veículos foram administrados por via *i.c.v.* (intracerebroventricular) em 3 administrações, 1h, 48h e 96h após o insulto. O primeiro tratamento corresponde à administração do composto em estudo ou do veículo uma hora após o término da neurocirurgia, o que representa o primeiro dia zero após o insulto. No segundo dia de tratamento foi administrada a segunda dose do composto em estudo e o quarto dia após a realização da neurocirurgia foi administrado a terceira dose dos tratamentos ou do veículo (Figura 8).

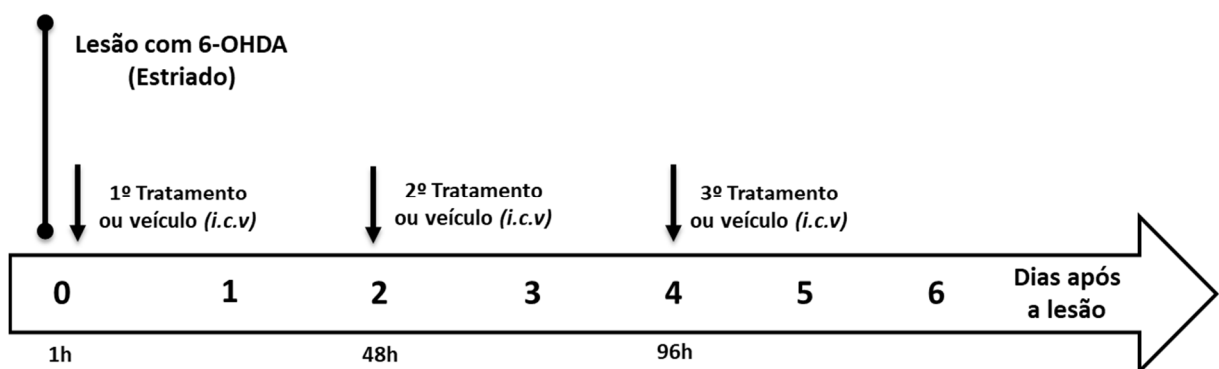


Figura 8. Esquema ilustrativo do delineamento experimental utilizado para a administração dos peptídeos ou veículo em estudo. No primeiro dia, os animais receberam uma injeção intraestriatal de 40µg/4 µL de 6-OHDA e uma cânula-guia foi implantada no ventrículo cerebral direito. Os compostos foram administrados por via *i.c.v.* 1h, 48h e 96h após a infusão de 6-OHDA pela cânula guia implantada durante o mesmo procedimento.

3.9 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

Para a avaliação da coordenação motora foi utilizado o desafio comportamental que se detecta a habilidade dos animais em se manter em uma barra giratória, e para essa análise quantifica-se o tempo de permanência dos animais previamente e posteriormente ao insulto por 6-OHDA, e nesse trabalho recebeu o nome de teste do Rotarod. O Rotarod utilizado na presente pesquisa (*Insight Equipamentos®*) é formado por uma barra giratória de metal de 5 cm de diâmetro que é movimentada por um motor na velocidade de 20 rpm a uma distância de 20 cm da base.

Para esse teste, os camundongos foram pré-treinados um dia antes da lesão por 6-OHDA e consistiu de 5 treinos dos animais em se manter na barra giratória no tempo de 300s por tentativa. No dia seguinte, que corresponde ao dia da injeção de 6-OHDA, os animais foram retestados no Rotarod e somente os animais que permaneceram por 300s foram selecionados e submetidos à lesão por 6-OHDA.

3.9.1 Avaliação da coordenação motora nos tempos de 48h, 72h, 96 horas após o insulto.

Após a indução da DP por 6-OHDA, os animais foram novamente submetidos ao teste de coordenação motora no Rotarod para a verificação de alterações comportamentais desencadeadas pelo processo induzido pela lesão por 6-OHDA (modificado de Lancu et al., 2005). Assim, os animais foram colocados na barra giratória apenas uma vez e o tempo de permanência registrado no segundo dia após a lesão que correspondeu ao tempo de 48 horas, o terceiro dia após a lesão

registrado como tempo de 72 horas e o quarto dia após a lesão que correspondeu ao último tempo testado com 96 horas após a lesão.

Todos os animais tratados com os peptídeos Fraternina-24, Fraternina-14 e Fraternina-10 e os grupos controles foram submetidos ao teste da avaliação da coordenação motora nos tempos 48h, 72h e 96 horas. Para os tratamentos que foram administrados no mesmo dia do teste, a avaliação ocorreu após 30 min da administração do fármaco (Figura 9).

3.9.2 Avaliação da coordenação motora no teste de permanência por 6 horas após a lesão por 6-OHDA.

No quarto dia após a lesão, a análise de alterações na coordenação motora dos animais foi realizada em um teste por 6 horas, que consistiu em uma avaliação do tempo em que os animais permanecem caminhando sobre a barra giratória. A latência de queda dos animais foi verificada nos intervalos de 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360, 1.440, 2.880 min (Tabela 4). O objetivo deste experimento foi averiguar o efeito dos peptídeos após a última administração ao longo de 6 horas (Figura 9).

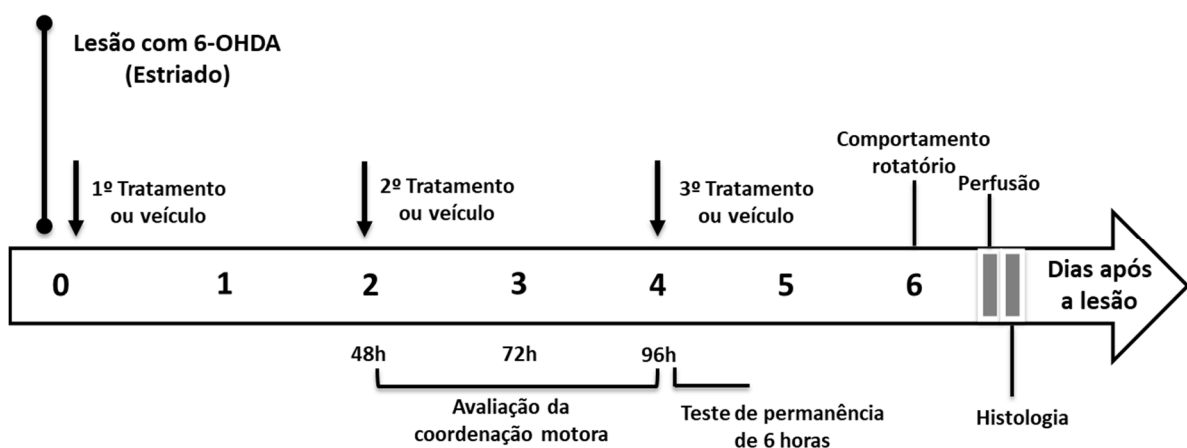


Figura 9. Esquema geral ilustrativo do delineamento experimental. A administração dos peptídeos ou veículo em estudo e os ensaios comportamentais foram realizados durante os sete dias de experimento. No primeiro dia, os animais receberam uma injeção intraestriatal de 6-OHDA (40ug/4 µL) com a implantação da cânula-guia no ventrículo cerebral direito. O teste de permanência por 6 horas ocorreu no quarto dia após a lesão. No sexto dia foi realizado o teste de comportamento rotatório após desafio com a apomorfina seguindo para a histologia.

Tabela 4: Duração do experimento e ensaios comportamentais ocorridos em cada dia com dos diferentes tratamentos.

| Duração | Ensaio comportamental | Tratamentos |
|---------|--|---|
| 1º dia | Injeção de (6-OHDA) e a Implantação da cânula guia | <u>1ª dose dos compostos</u> Fraternina-24, Fraternina-14, Fraternina-10, veículo e 6-OHDA |
| 2º dia | Sem avaliação comportamental | |
| 3º dia | Avaliação da coordenação motora tempo 48' | <u>2ª dose dos compostos</u> Fraternina-24, Fraternina-14, Fraternina-10, veículo e 6-OHDA |
| 4º dia | Avaliação da coordenação motora tempo 72h | |
| 5º dia | Avaliação da coordenação motora tempo 96h Teste de permanência de 6 horas | <u>3ª dose dos compostos</u> Fraternina-24, Fraternina-14, Fraternina-10, veículo e 6-OHDA |
| 6º dia | Sem avaliação comportamental | |
| 7º dia | Comportamento rotatório após desafio com apomorfina, perfusão e histologia | |

3.9.3 Avaliação da neurotoxicidade dos peptídeos

Com o intuito de avaliar efeitos neurotóxicos dos peptídeos e que poderiam impedir a performance motora dos animais foi realizada uma análise do tempo de permanência dos animais na barra giratória do Rota rod durante 6 horas. Logo, no

modelo de ensaios de neurotoxicidade foram utilizados camundongos *Swiss (Mus musculos)* machos com aproximadamente 26g. Os peptídeos sintéticos foram administrados nas mesmas doses utilizadas para os tratamentos, por via *i.c.v* seguindo os mesmos protocolos experimentais anteriormente descritos, sem a indução da lesão por 6-OHDA.

3.9.4 Comportamento rotatório após desafio com Apomorfina

Foi utilizado um segundo teste para determinar o efeito da lesão no modelo murino da DP. O teste selecionado foi o desafio com agonistas dopaminérgicos (apomorfina), em animais com lesão na via nigroestriatal, uma indução com o agonista dopaminérgico induz rotações no sentido contralateral à lesão. Após o desafio com a apomorfina, o comportamento rotatório dos animais foi avaliado por meio da contagem do número de rotações de 360°. Para isto, no sexto dia após a lesão por 6-OHDA, os animais receberam uma injeção subcutânea do agonista dopaminérgico apomorfina (AP) (5 µg/animal - Sigma). Após a injeção, os animais foram colocados em uma arena de 30 cm de diâmetro para a habituação durante 5 minutos e filmados por mais 15 min por uma câmara acoplada a um computador a fim de verificar o número de rotações exibidas pelo animal.

3.9.5 Perfusão e histologia

Após a administração dos compostos e da avaliação comportamental, os animais foram profundamente anestesiados por via *i.p.* com

tiopental sódico 120 mg/Kg e em seguida perfundidos por via transcardíaca inicialmente com 50ml de solução salina a 0,9%, seguida de 100ml de solução fixadora de formaldeído a 4%. Os cérebros foram mantidos na solução fixadora por 24 h.

Após este período, os cérebros foram colocados em solução de sacarose a 30% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,4) por 48 horas e em seguida, seccionados horizontalmente a 50 μ m de espessura, utilizando-se um vibrátomo (KD- 400 Vibration Microtome, Zhejiang Jinhua Kedi Instrumental). Os cortes coronais seriados foram selecionados de acordo com o atlas (PAXINOS; FRANKLIN, 2004) que após a identificação foram colocados em compartimentos com solução *anti-freezing* até o processamento.

3.9.6 Verificação da correta posição da cânula guia

Após a eutanásia dos animais, para que fosse verificado a correta posição das injeções dos tratamentos, foi realizada a administração de 3 μ L de azul de metileno pela cânula guia e as cicatrizes e a marcação com o corante foram analisados com corte em uma matriz ou por fatias coronais seccionados a 50 μ m de espessura, utilizando-se um vibrátomo e avaliados em microscópio de luz. Foram considerados para a análise, os cérebros dos animais que apresentaram a coloração azul nos dois ventrículos cerebrais ou a cicatriz correspondente ao da cânula (Figura 10).

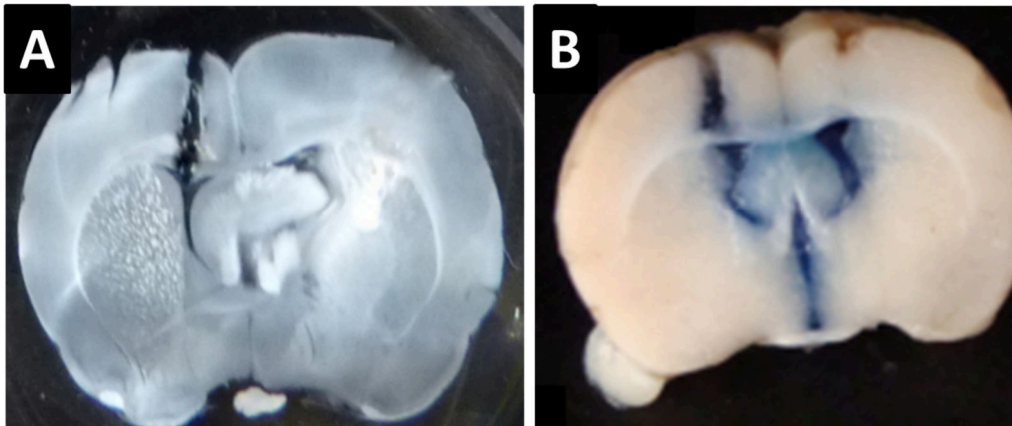


Figura 10: Representação esquemática das formas de verificação da correta posição da cânula guia para administração das injeções do tratamento. Em A, fatia cerebral de camundongo com 50 μ m de espessura demonstrando o rasgo da cânula guia. B: Marcação com o corante azul de metileno em uma fatia do cérebro de camundongo utilizada no experimento (Fonte Anjos, 2016).

3.10 DETECÇÕES PELA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA

3.10.1 Avaliação viabilidade de neurônios reativos a tirosina hidroxilase

Para a determinação da reatividade de neurônios dopaminérgicos contra a tirosina hidroxilase (TH) foi realizada a quantificação pela técnica de imunohistoquímica. Sendo assim, foram utilizados anticorpos primários policlonais, contra tirosina hidroxilase produzidos em coelho (Abcam), em uma diluição de 1:1000 e o anticorpo secundário policlonal (Abcam) produzido em cabra contra IgG – H&L de coelho com o fluoróforo Alexa flúor-488 em uma diluição de 1:400.

Os cortes foram lavados em solução tampão salina-fosfato, duas vezes por 10 minutos e permeabilizados na mesma solução com 0,8% Triton X-100 por 1 hora. Após o tempo de permeabilização, foram realizadas 3 lavagens com o tampão salina-fosfato por 5 minutos e os cortes foram submetidos a uma solução bloqueadora “Protein Block” (1% BSA, 10% leite desnatado, 0,3M de glicina,

0,1%Tween 20) por 1 hora. Em seguida, as fatias foram novamente lavadas 3 vezes com o tampão 44 por 5 minutos e incubadas com o anticorpo primário por 48h a 4°C, sob agitação constante.

Após a incubação, o material foi submetido a três lavagens de 10 minutos cada com o tampão salina-fosfato. Os cortes foram incubados com o anticorpo secundário na concentração de 1:400, diluído em tampão salina-fosfato + 1% BSA, à temperatura ambiente e agitação constante por 3 horas no escuro. Em seguida, foram feitas três lavagens de 4 minutos cada no escuro. As fatias foram montadas com Montagem Fluorescente Média com DAPI (20ml) (Sigma). Para a montagem das lâminas, uma gota do DAPI foi colocada em cima de cada corte e deixado a temperatura ambiente por 5 minutos, antes de colocar as lamínulas e vedar com esmalte incolor.

3.10.2 Análise por Microscopia de Epifluorescência

Os cortes obtidos pelo método de dupla marcação foram analisados utilizando-se um microscópio epifluorescente (Leica DM 2000), equipado com uma câmera digital. As fotomicografias foram documentadas no aumento de 20X. O local analisado corresponde à região da Substância negra (SN), dividido em citoplasma celular reativo a TH que apresentaram a emissão decoloração em verde e os núcleos que apresentam a coloração em azul (LI; ZHOU, 2013) (Figura 11).

A quantificação de neurônios reativos a tirosina hidroxilase foi realizada em fatias cerebrais dos animais tratados com os peptídeos Fraternina-24 e Fraternina-14 e Fraternina-10 e com os grupos controles.

Para a quantificação da lesão foi utilizada a contagem dos neurônios reativos a TH na região da SN. Para esta contagem, foram utilizados de 2-3 fatias cerebrais de cada grupo. Foram considerados como neurônios viáveis aqueles que continham seus citoplasmas e núcleos que emitiam a fluorescência (Figura 11). Os resultados foram analisados na proporção de neurônios presentes na região lesada em relação ao lado veículo do corte.

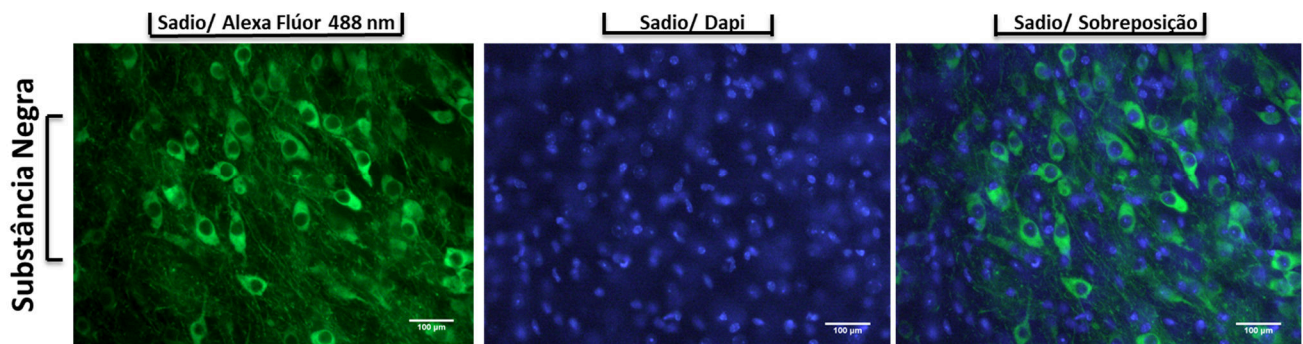


Figura 11: Imagem demonstrativa para quantificação de neurônios reativos a TH na região da SN. Consideraram-se os neurônios que continham os citoplasmas que emitiam a fluorescência em verde (Veículo/Alexa flúor-488) e os núcleos marcados a partir de um meio de montagem Fluorescente Média com DAPI (Veículo/Dapi). Dupla marcação dos neurônios com citoplasmas em verde e núcleos em azul (Veículo/ Sobreposição).

3.11 DOSAGEM DE CITOCINAS

Após a realização do protocolo experimental, os camundongos (n = 4 animais / 5 grupos) foram eutanasiados e seus encéfalos removidos sobre uma superfície congelada, para a verificação da correta posição da cânula guia. Logo após, o tecido foi colocado em tubos com 3 esferas de aço (2-3/tubo) e adicionado 1 mL de PBS gelado e mantido no gelo até o procedimento da homogeneização do tecido. Os cérebros foram macerados em Precellys® 24 (Figura 12) a 4000 rpm, em 3 ciclos de 15 segundos cada, com 005 segundos de intervalo entre os ciclos. Em seguida, os

tubos foram centrifugados a 1000 xg á 4°C, durante 2 minutos para a separação dos fragmentos teciduais remanescentes da fase líquida que contém as citocinas. O sobrenadante foi separado e congelado a -80°C até o uso.

O sobrenadante foi utilizado para dosagens das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α pelo método de Elisa (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), de acordo com as instruções do kit ELISA Ready – SET-GO (affymatrix-eBioscience, San Diego, CA, EUA). As amostras foram quantificadas por comparação com curvas padrão de citocinas para camundongos. Os resultados foram expressos como a média aritmética e erro padrão da média. Os dados foram submetidos ao teste t de student para amostras independentes. Os limites de detecção foram de 8 pg/mL para IL-1 β , 4 pg/mL para IL-6, 8 pg/mL para TNF- α e 32 pg/mL para IL-10.

Para a padronização deste experimento foram realizados testes no qual utilizou-se separadamente cada hemisfério cerebral, tanto de animais doentes (lesionados por 6-OHDA) como também de animais *Naive* ou veículos (grupo saudável, que não passou por nenhum experimento). O objetivo deste teste foi de verificar a liberação de mediadores inflamatórios de modo diferenciado entre os hemisférios, visto que a infusão do composto neurotóxico 6-OHDA realizado na região do estriado direito da via nigroestriatal atinge áreas de somente um hemisfério (dados não demonstrados).



Figura 12. Equipamento Precellys. Foto: Andreia Biolchi Mayer (Fev. 2018).

3.12 ENSAIO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

3.12.1 Atividade Hemolítica dos Peptídeos

A capacidade em induzir hemólise dos peptídeos Fraternina-24, Fraternina-14 e Fraternina-10 foi avaliada utilizando um protocolo adaptado de RANGEL et al., 2011, onde os eritrócitos foram obtidos a partir de camundongos Swiss veículos. Em seguida essas células foram lavadas em solução de Krebs (113 mM NaCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 4,0 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 2,5 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, 11,1 mM C₆H₁₂O₆, pH 7,4), centrifugados (5000 rpm, 5 minutos) e ressuspensos, obtendo-se uma suspensão de eritrócitos a 4%.

Posteriormente, foi incubado 50µl dessa suspensão com 50 µl dos peptídeos testados, sob 12 diferentes concentrações (500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,813, 3,906, 1,953, 0,977, 0,488 e 0,244 µM) diluídos seriadamente em placa de cultivo celular de 96 poços, em triplicata, e em dias independentes de modo que a maior concentração dos peptídeos foi de 500 µM e a menor de 0,244 µM. As placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação constante e

centrifugadas a 1000xg durante 5 min. O sobrenadante foi transferido para uma nova placa de cultivo celular e a hemoglobina liberada foi monitorada pela medida da absorbância a 550 nm utilizando o leitor de placas Flex Station 3 (Molecular Devices®). Para o controle negativo, realizou-se a incubação as suspensão de eritrócitos a 4% com a solução de Krebs (branco, 50 µl de Krebs) e para o controle positivo com Triton X-100 a 1% (50 µl de Triton X-100). Estes foram usados como 0% e 100% de hemólise, respectivamente.

3.13 NEUROQUÍMICA

3.13.1 Avaliação de interação com a neurotransmissão glutamatérgica

A interação dos peptídeos na neurotransmissão glutamatérgica foi testada através da técnica de ligação (binding) em córtices cerebrais de ratos.

A preparação sinaptosomal foi realizada segundo o método descrito por (BERMEJO et al., 2014), utilizando-se de córtices cerebrais de ratos *Wistar* (200-250g). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e após serem decapitados o crânio foi exposto e os cérebros foram removidos imediatamente. Após a separação da região cortical em duas metades o tecido foi rapidamente imerso em solução de sacarose 0,32M. Para manter a integridade do tecido, os córtices foram mantidos em banho de gelo durante todo o procedimento.

Após esta etapa, os córtices foram homogeneizados em um desruptor de células Ultra-Sônico (Unique DES500) com a potência de 90 Watts (RMS) por 5 vezes de 45 segundos cada. Em seguida, o homogeneizado obtido foi centrifugado a

(900 xg), por 10 minutos, a 4°C, e o sobrenadante (S1) coletado e novamente centrifugado a (20442 xg), por 20 minutos a 4°C. Antes que o sobrenadante fosse totalmente descartado uma alíquota (A1) de 500 µL foi separada, para posterior quantificação. O precipitado (P1) foi reconstituído em um volume de 6 mL de sacarose 0,32M; e novamente homogeneizado (S2), com a retirada nesse momento da segunda alíquota (A2) de 500 µL . Após a preparação do gradiente descontínuo de sacarose, o homogeneizado foi adicionado cuidadosamente à última camada do gradiente descontínuo de sacarose e ultracentrifugado a (21.500xg) por 3 horas na temperatura de 4°C. A Fração de Membranas Sinaptossomal (FMS) foi visualizada no Gradiente Descontínuo de Sacarose (GDS) sendo retirada do gradiente com o auxílio de uma pipeta sorológica, e realizada a medição do volume de suspensão total (1,5 V de tampão tris-HCl 5mM, pH 7,4), e novamente centrifugado a (27.216xg) por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi reconstituído em um volume de 5mL de tampão tris-HCl 5mM, pH 7,4 e após a homogeneização foi retirada a terceira alíquota (A3). Em seguida, o homogeneizado permaneceu por 30 minutos em agitação branda e em banho de gelo. Em seguida o material foi centrifugado a (30.966xg) por 5 minutos a 4°C por 5 vezes consecutivas sempre ressuspendido em 5ml de tampão Tris-HCl 5 mM (pH 7,4), e na última centrifugação a reconstituição do pellet foi em 2 mL de tampão Tris-HCl 5 mM (pH 7,4), tendo o seu conteúdo proteico determinado pelo método de LOWRY et al. (1951), modificado por Hartree, 1972, utilizando albumina bovina como padrão.

As membranas assim obtidas foram alíquotadas em eppendorfs e centrifugadas a 16000rpm a 4°C por 5 minutos e estocadas – 20°C, por no mínimo 18 horas e no máximo por 30 dias para os testes (Figura 13).

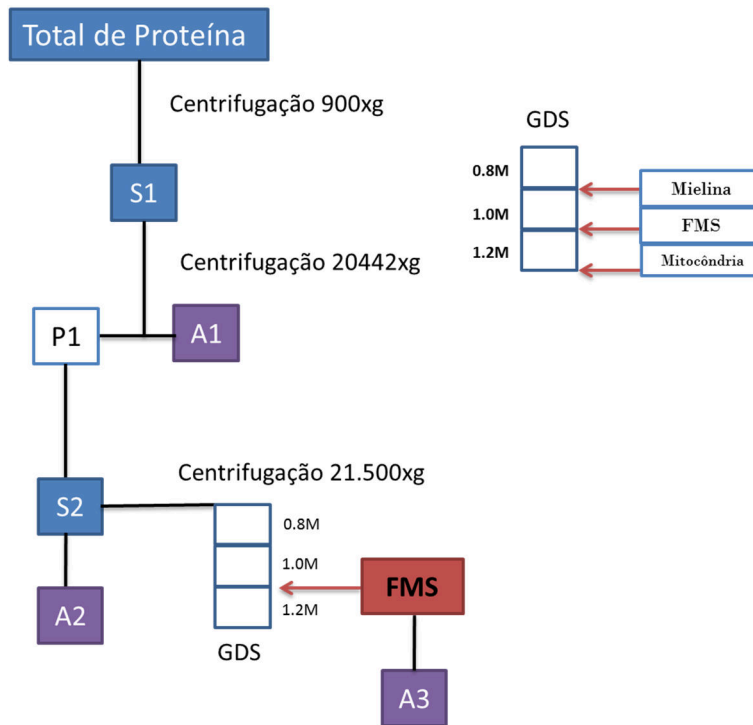


Figura 13: Representação esquemática da preparação das membranas e separação da Fração de Membranas Sinaptossomal (FMS).

3.13.2 Gradiente Descontínuo de Sacarose (GDS)

Para a realização do GDS foi adicionado em tubo para centrifuga refrigerada 3,5 ml de solução de sacarose a 1,2 M formando a primeira camada e em seguida cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta foi adicionado 3,0 mL de sacarose a 1,0 M e mais 3ml de sacarose a 0,8 M totalizando 9.5ml (Figura 14-A). Após a realização de GDS, a proteína (6 ml) foi acrescentada a última camada. Posteriormente a ultracentrifugação, o tubo foi retirado cuidadosamente da ultracentrifuga para que não ocorra perturbação no gradiente (Figura 14-B), e utilizando uma pipeta pasteur as duas primeiras camadas constituídas respectivamente por mielina e pela sacarose a 0,8 M foram removidas e

desprezadas. Em seguida foi retirado a Fração de Membranas Sinaptossomais (FMS) que encontrava-se na interfase das camadas de 1,0 M e 1,2 M (Figura 14-C).

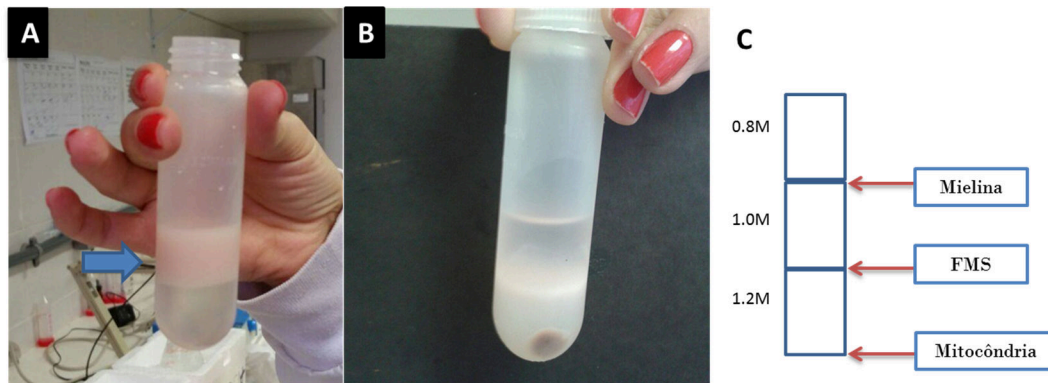


Figura 14: Representação esquemática do gradiente descontínuo de sacarose (GDS) antes e após ultracentrifugação. Em A: após a preparação do gradiente a amostra que está em solução sacarose 0,32M, indicado pela seta azul é inserida acima da última camada do gradiente, as fases do GDS só são visíveis quando o tubo é mantido contra a luz. Em B: após a ultracentrifugação, o homogeneizado irá separar-se em várias frações. A fração apresentada entre as camadas de 0,8 e 1,0M de sacarose é constituída de membranas de mielina. A fração inserida entre as camadas 1,0 e 1,2M de sacarose apresenta a FMS que foi recolhida com o auxílio de uma pipeta pasteur, o sedimento formado no fundo do tubo corresponde as mitocôndrias. Em C: representação esquemática das camadas organizadas em por diferentes concentrações de sacarose (0,8M; 1,0M e 1,2M) e da separação da fração de PMS isolada com base na sua densidade sendo apresentada entre as interfases de 1,0M e 1,2M de sacarose.

3.13.3 Estudo da ligação de ^3H -Glutamato em membranas cerebrocorticais

Para o ensaio de competição à ligação por ^3H -Glutamato, foram realizados 3 experimentos independentes, em triplicata, na presença ou ausência de 6 diferentes concentrações dos peptídeos sintéticos Fraternina-24 e Fraternina-10, além dos respectivos controles, sendo que o controle positivo foi representado pelo glutamato não marcado (concentração final de 1mM). A radioatividade foi determinada em cintilador líquido (PerkinElmer®), com 2% de erro e eficiência de contagem para o ^3H

de aproximadamente 35 a 40%. O material radioativo foi adquirido junto à GE Healthcare, (Ofício 5943/2014-CGMT/CNEN) (Anexo 2) com atividade de 89.8 Ci/mmol.

Para este experimento, iniciou-se o descongelamento da FMS e realizou-se 5 lavagens com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) para o rompimento das vesículas com centrifugações a (20500 xg) por 5 minutos à 4°C. Após a última centrifugação o FMS foi ressuspensionado em 1 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, a fim de que a concentração final de proteína fosse igual a 1mg/mL, quantidade considerada adequada para realização do experimento. A reação, então, foi iniciada a partir da adição de 50nM de [3H]-L-Glutamato e tampão à suspensão de membranas, na presença ou ausência de 6 diferentes concentrações dos peptídeos, diluídas em série (1000µM, 100 µM, 10 µM, 1µM, 100nM e 10nM concentrações finais), em um volume final de 152 µL por tubo por tubo (Tabela 4). Seguiu-se para incubação, de todos os tubos, a 25°C para o [3H]-L-Glutamato, sob agitação por 10 minutos. Para finalizar a reação de ligação foi realizada uma centrifugação a (20500xg), por 15 minutos, à 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados lavados em água destilada gelada e acrescidos de 125µL de Tris-HCl 50mM, ressuspensionados e em seguida acrescidos de 125µL de líquido de cintilação biodegradável (Fisher®). Os parâmetros determinados para o tempo de incubação, concentração do substrato radioativo e da PMS foram realizadas de modo que estes permanecessem dentro da porção linear da curva de ligação, como definido em estudos prévios (BELEBONI et al., 2006) (Figura 15).

Tabela 5: Distribuição do volume de cada tubo utilizado no ensaio de ligação de [3H]-L-Glutamato.

| Quantidade de μL /tubo | TUBOS | | | |
|--------------------------------------|--------|--------|--------|---------|
| | 01/fev | 03/abr | 05/jun | 7 ao 12 |
| [3H]-L-Glu (μL) | 4 | | 4 | 4 |
| Glu frio (μL) | | | 10 | |
| Fraternina (μL) | | | | 10 |
| Tris-HCl 50 mM (μL) | 48 | 52 | 38 | 38 |
| PMS (μL) | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Volume Total | 152 | 152 | 152 | 152 |

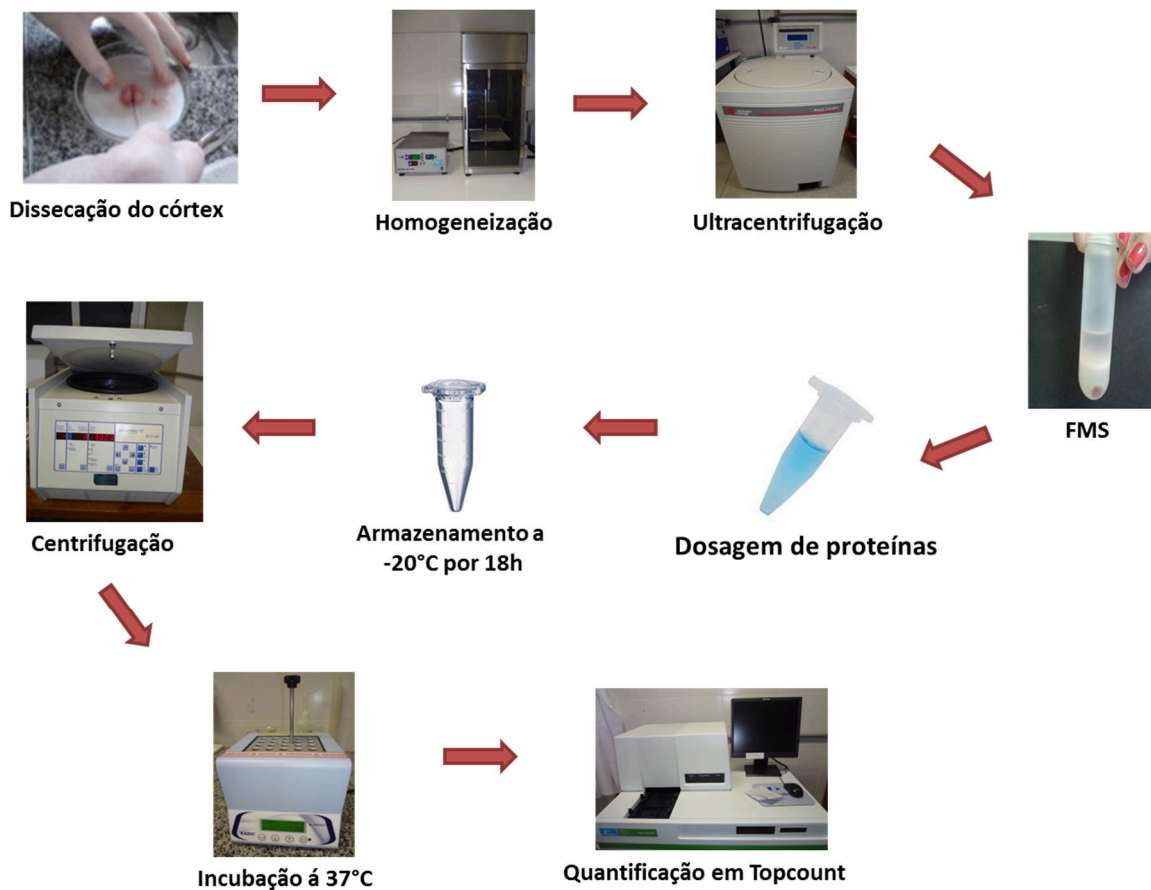


Figura 15. Representação esquemática da metodologia para o ensaio de estudos de ligação (binding).

3.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística dos dados experimentais obtidos foi realizada por meio do software GraphPad Prism® 7.0 (San Diego, CA, USA). Para valores estatisticamente significantes será considerado $p < 0,05$.

Para comparações envolvendo mais de dois grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste de Tukey, para distribuições normais de variância semelhante, considerando-se significativos os valores de $p < 0,05$.

Os resultados com distribuição normal e com duas variáveis foram submetidos ao teste de análise de variância de medidas repetitivas de duas vias (*two-way* ANOVA), sendo utilizado o Bonferroni como pós-teste.

Para os ensaios de captação e recaptção (binding) sinaptossomal de Glutamato, na presença e ausência de diferentes concentrações dos peptídeos Fraternina-24 e Fraternina-10, foi usado o teste de ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DAS TRÊS NOVAS SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS

4.1.1 Desenho dos Peptídeos

Os peptídeos desenhados foram comparados por buscas por similaridades em bancos de dados adequados (Figura 16). De acordo com esses dados, foi constatado que o peptídeo Fraternina-24 apresenta similaridades de 50% de identidade com o peptídeo Silverina, 25% com o peptídeo Exenatide e 29% de similaridade com o peptídeo GLP1-pI14a. O peptídeo Fraternina-14 apresentou 64% de similaridade com o peptídeo Silverina e 35% com o peptídeo GLP1-pI14a. O peptídeo Fraternina-10 apresentou 30% de similaridade com o peptídeo Silverina, e 50% de similaridade tanto para o peptídeo Exenatide quanto para o GLP1-pI14a.

| | | | |
|---------------------|--|----|-----|
| Fraternina 24 | -----LSFQKVKEKVCKVA---EKLKGLPFC--- | AA | %ID |
| sp P26349 Exenatide | HGEGTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPS | 24 | |
| sp P0C1R2 Silverina | -----SIKEKICKII--EAKIGKKPPFCP-- | 39 | 25 |
| GLP1-pI14a | HGEGTFTSDLKQMEEEAVRCFIECLKGIGHKYPFCHCR | 22 | 50 |
| | :* : . * . | 39 | 29 |
| | | | |
| Fraternina 14 | -----CK----VAEKLKGLPFC--- | AA | %ID |
| sp P26349 Exenatide | HGEGTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPS | 14 | |
| sp P0C1R2 Silverina | -----SIKEKICK---IIEAKIGKKPPFCP-- | 39 | 00 |
| GLP1-pI14a | HGEGTFTSDLKQMEEEAVRCFIECLKGIGHKYPFCHCR | 22 | 64 |
| | : * . | 39 | 35 |
| | | | |
| Fraternina 10 | -----LSFQKVKEKV----- | AA | %ID |
| sp P26349 Exenatide | HGEGTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPS | 10 | |
| GLP1-pI14a | HGEGTFTSDLKQMEEEAVRCFIECLKGIGHKYPFCHCR | 39 | 50 |
| sp P0C1R2 Silverina | -----SIKEKICKIIE--AKIGKKPPFCP-- | 39 | 50 |
| | :* : | 22 | 30 |

Figura 16: Alinhamentos das sequências primárias de aminoácidos dos peptídeos sintéticos Fraternina-24, Fraternina-14 e Fraternina-10. São exibidas comparações com outras sequências

anteriormente descritas na peçonha de Himenópteros. (AA) corresponde à quantidade de aminoácidos. (%ID) corresponde ao percentual de identidade dos peptídeos em relação aos outros peptídeos presentes na representação. (*) resíduo igual; (:) modificação conservativa; (.) modificação semi-conservativa; espaço em branco corresponde a ausência de identidade entre os resíduos.

4.2 PREDIÇÃO DE ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DOS PEPTÍDEOS

4.2.1 Modelagem da estrutura tridimensional dos peptídeos

O primeiro peptídeo Fraternina-24 trata-se de um peptídeo composto por 24 resíduos de aminoácidos, sendo dois deles cisteína (Cys11 e Cys24), com massa molecular teórica de 2.748,50 Da. Os dois modelos com melhores scores obtidos, tanto pelo servidor I-Tasser quanto pelo Quark, revelam uma estrutura secundária composta preferencialmente por α -hélice. Em ambos os modelos, as extremidades N- e C-terminais não apresentam uma estrutura secundária definida, sugerindo que essas regiões possuam alta flexibilidade. A proximidade entre os dois resíduos de cisteína (marcados em verde) sugere a possibilidade da formação de uma ponte dissulfeto (Figura 17-A e B). O modelo obtido tem como molde uma molécula quimera entre peptídeo 1 truncado glucakon-like (GLP-1), exendina-4 e o peptídeo pl14a (α -conotoxina) – PDB ID 2NAW com 4 cisteínas e 2 pontes de sulfeto e uma dessas pontes estão em posição conservada em relação ao peptídeo Fraternina-24 (SWEDBERG et al., 2016) (Figura 17-G).

Da mesma forma, o segundo peptídeo Fraternina-14 apresenta 14 resíduos de aminoácidos, sendo dois deles de cisteína (marcados em vermelho, Cys1 e Cys14), massa molecular teórica de 1.560,96 Da e ponto isoelétrico médio teórico de

9.31 (ExPASy) (Figura 17-E e F). O modelo com melhor score obtido pelo servidor I-Tasser revela uma estrutura secundária composta preferencialmente por α -hélice, apresentando região C-terminal sem estrutura secundária definida. O modelo obtido tem como molde a Toxina MMP23 (metaloproteinase 23) de *Rattus norvegicus* com ação moduladora de canais de potássio – PDB ID 2K72 (Figura 17-I). E por último o peptídeo Fraternina-10 apresenta 10 resíduos de aminoácidos com ausência de resíduos de cisteína, massa molecular teórica de 1.456,71 Da e ponto isoelétrico médio teórico de 9.70 (ExPASy). O modelo com melhor score obtido pelo servidor I-Tasser revela uma estrutura secundária composta preferencialmente por α -hélice, apresentando região N-terminal sem estrutura secundária definida. O modelo obtido tem como molde a Proteína p9 GAG do vírus da anemia infecciosa equina (Figura 17-H).

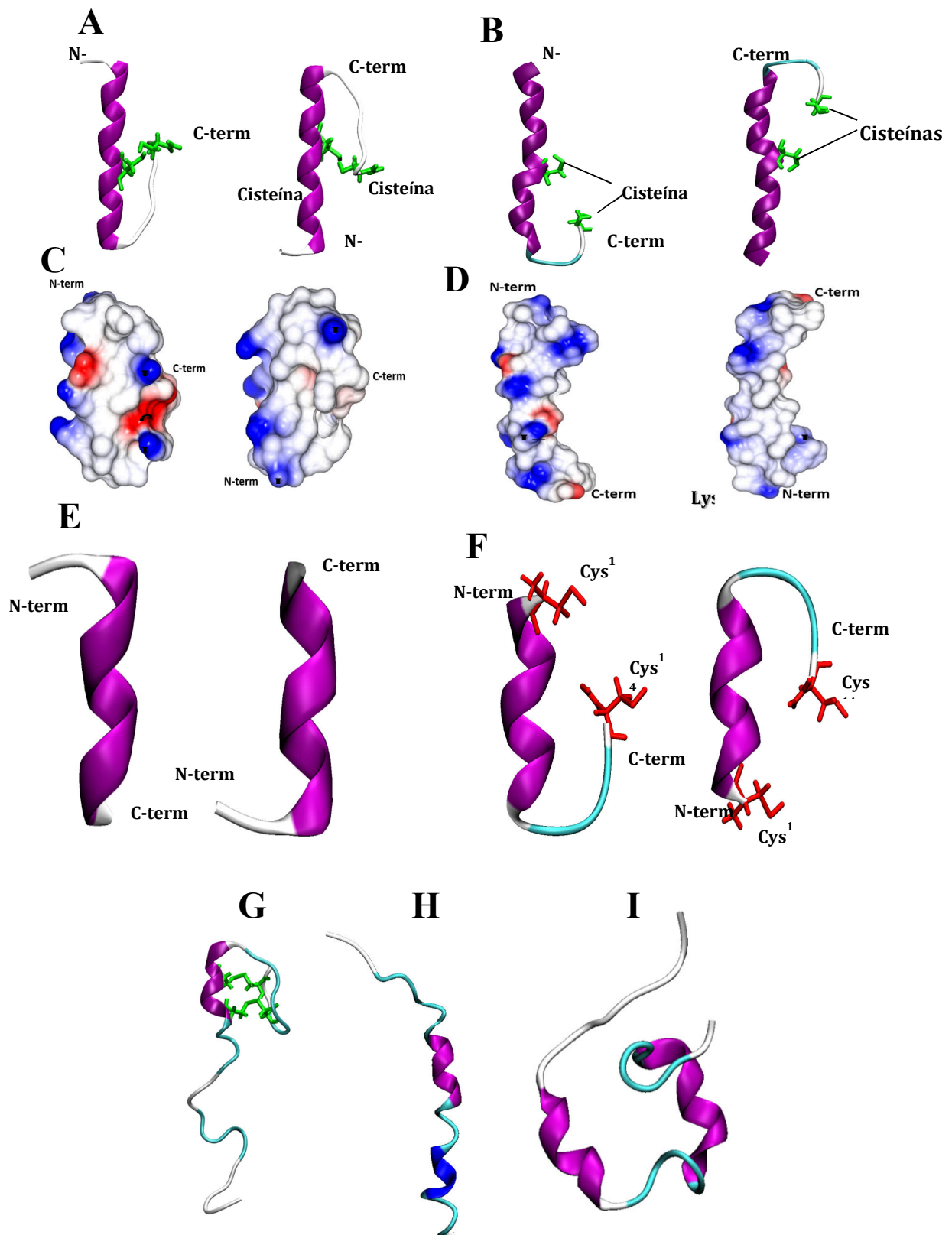


Figura 17: Representação do modelo da estrutura tridimensional dos peptídeos sintéticos Fraternalina-24, Fraternalina-14 e Fraternalina-10 desenvolvido pelo método *Threading* gerado pelo servidor *I-Tasser* (*Iterative Threading Assembly Refinement*) <http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/> e pelo

Método de novo realizado pelo servidor QUARK <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/QUARK/>. Em A, representação do Peptídeo Fraterina-24 pelo servidor *I-Tasser* com a presença predominante da conformação em alfa hélice, com as extremidades randômicas e livres evidenciando pelas regiões flexíveis da molécula. Em B, representação do Peptídeo Fraterina-24 pelo servidor QUARK, o peptídeo apresenta conformação do tipo alfa-hélice, ligação entre duas cisteínas chamada de ponte dissulfeto entre o aminoácido 11 e o aminoácido 24 da região C-terminal da molécula. Em C e em D, interações eletrostáticas (Potencial Eletrostático-PE) entre os átomos determinadas pelas cargas apresentadas pelos aminoácidos. Regiões negativas em vermelho e as regiões positivas em azul. Em E, modelo da estrutura tridimensional do peptídeo Fraternina-10 desenvolvido pelo método *Threading* gerado pelo servidor *I-Tasser* (*Iterative Threading Assembly Refinement*) <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> e em F, modelo da estrutura tridimensional do peptídeo Fraternina-14 desenvolvido pelo método *Threading* gerado pelo servidor *I-Tasser* (*Iterative Threading Assembly Refinement*) <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>. Em G, representação do modelo obtido da estrutura tridimensional do peptídeo 1 truncado glucakon-like (GLP-1), exendina-4 e o peptídeo p114a (α -conotoxina). Em H, modelo obtido da estrutura tridimensional da Proteína p9 GAG do vírus da anemia infecciosa equina – PDB ID 2K84 e em I, estrutura modelo da Toxina MMP23 (metaloproteinase 23) de *Rattus norvegicus* com ação moduladora de canais de potássio – PDB ID 2K72.

4.3 AVALIAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS NO MODELO MURINO DA DP

4.3.1 Confirmação da Análise por Espectrometria de Massas

Após a síntese dos compostos, todos os peptídeos foram submetidos a técnica de espectrometria de massa utilizando MALDI TOF/TOF (Matriz-assisted laser desorption ionization time of flight) Autoflex speed (Bruker Daltonics®, Alemanha), para a certificação de massas moleculares (MS), para a inspeção das suas respectivas sequências primárias de aminoácidos (sequenciamento *de novo*) (MS/MS), assim como, para as verificações do grau de pureza de cada peptídeo. Ambos os compostos sintetizados apresentaram grau de pureza >99%, e a análise por cromatografia e espectrometria de massa foram fornecidos pela empresa (Anexos 3-8).

4.3.2 Efeito dos tratamentos no teste de coordenação motora (48h, 72h, 96 horas) após a lesão.

Para determinarmos o efeito neuroprotetor dos peptídeos, foram realizadas diferentes avaliações comportamentais após o insulto e tratamentos. A avaliação da coordenação motora foi verificada no segundo dia após o insulto (tempo 48h), no terceiro dia (tempo de 72h) e no quarto dia e último teste (tempo de 96h).

Para o peptídeo Fraternina-24, a análise de variância de medidas repetitivas de duas vias (*two-way* ANOVA) não mostrou diferenças significativas em relação à interação tempo versus tratamento [$F_{(14,100)} = 0,5898$; $p < 0,8674$] e ao longo do tempo [$F_{(2,100)} = 1,403$; $p = 0,2505$]. Em relação ao tratamento, diferenças significativas foram observadas nos diferentes tempos do teste [$F_{(7,50)} = 46,86$; $p < 0,0001$] em relação ao grupo veículo, que foi confirmada pelo pós-teste de comparação múltipla de Tukey. Sendo assim, os grupos tratados em todas as doses e o grupo L-DOPA apresentaram valores similares ao grupo 6-OHDA (Figura 18-A).

Em relação à avaliação motora para os animais tratados com o peptídeo Fraternina-14, a análise (*two-way* ANOVA) seguido do pós teste de Tukey não demonstrou diferenças significativas em relação a interação tempo versus tratamento [$F_{(10,76)} = 0,4539$; $p < 0,9141$] e ao longo do tempo [$F_{(10,76)} = 1,447$; $p = 0,2417$] mas, quanto aos tratamentos [$F_{(5,38)} = 26,68$; $p < 0,0001$], todas as doses avaliadas (6,4 nmol, 3,2 nmol e 0,6 nmol) ($p < 0,01$) e o grupo L-DOPA ($p < 0,01$) obtiveram diferenças relevantes em relação ao grupo veículo, o que resultou em uma alta taxa de latência de queda dos animais quanto aos tempos avaliados (Figura 18-B).

Para os grupos tratados com o peptídeo Fraternina-10 verificou-se por meio da análise estatística (*two-way* ANOVA) que a relação da interação tempo versus tratamento [$F_{(10,84)} = 0,4132$; $p < 0,9368$], tratamento [$F_{(5,42)} = 8,669$; $p < 0,0001$] e ao longo do tempo [$F_{(2,84)} = 8,622$ $p = 0,2036$] não foi significativa, contudo, ocorreu um aumento da permanência dos animais no tempo de 48 horas para o tratamento na dose de 0,8 nmol ($p < 0,05$). Os tratamentos nas doses de 8,3 nmol e 4,1 nmol juntamente com o tratamento L-DOPA foram semelhantes ao grupo veículo e desta forma confirmando que os animais não permaneceram um maior tempo na barra giratória (Figura 18-C).

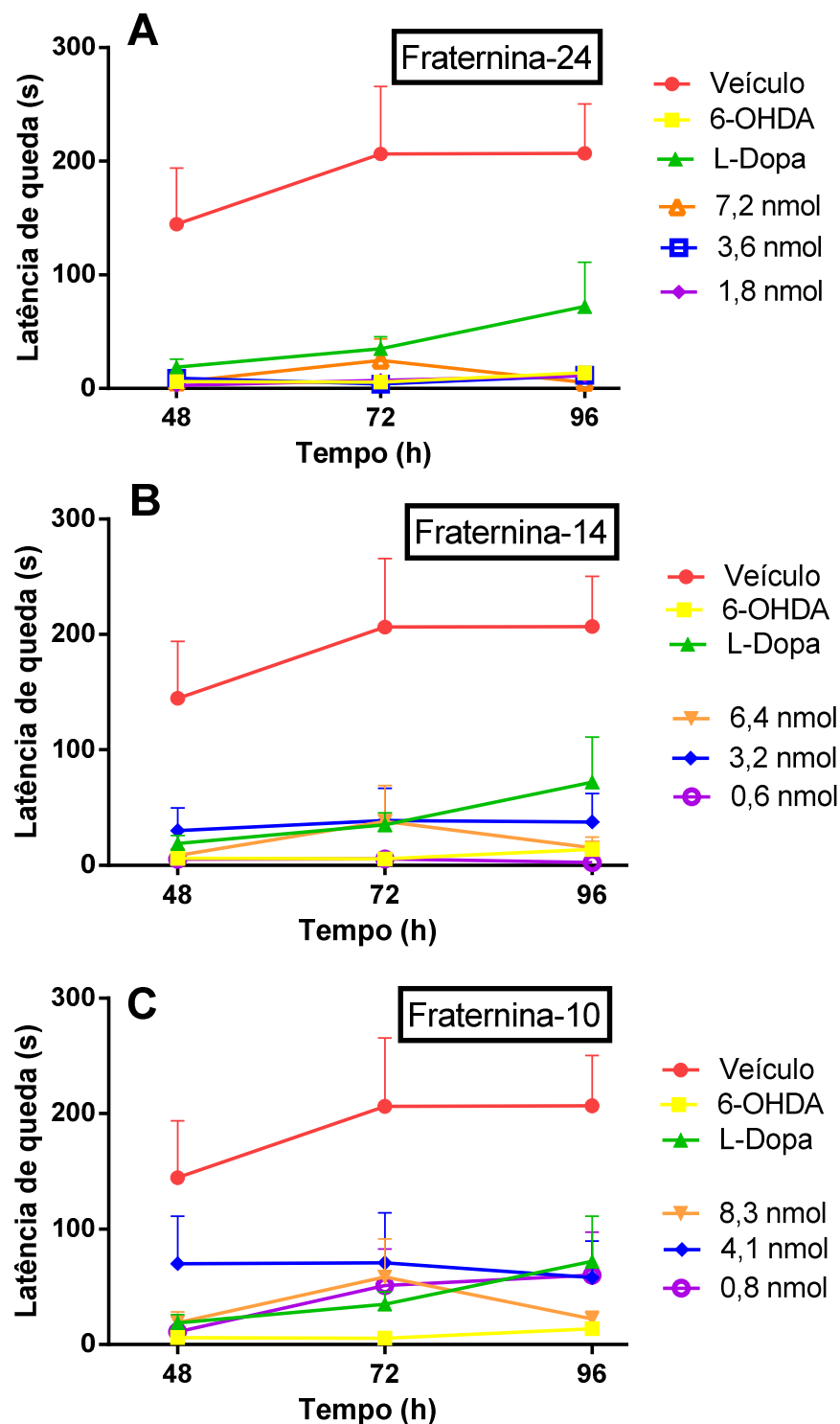


Figura 18: Efeito dos peptídeos sintéticos no teste de coordenação motora nos tempos 48h, 72h e 96h após o insulto por 6-OHDA. Grupos controles: 6-OHDA (6-OHDA, n = 7) e grupo Veículo (veículo, n = 6) e grupo L-DOPA (L-DOPA, n = 8). Em A: Fraternalina-24; 7,2 nmol (n=8), 3,6 nmol (n=9), 0,36 nmol (n=5), 1,8 nmol (n=8), 0,18 nmol (n=8). Em B: Fraternalina-14; 6,4 nmol (n=8), 3,2 nmol (n=7), 0,6 nmol (n=8). E em C: Fraternalina-10; 8,3 nmol (n=8), 4,1 nmol (n=9), 0,8 nmol (n=10).

4.3.3 Efeito dos tratamentos no teste de permanência de 6 horas

No quarto dia após a indução da DP, os animais foram avaliados por meio de um teste que consistiu em 13 análises da coordenação motora dos animais. A avaliação da gravidade da descoordenação foi realizada após 30 minutos da administração da terceira dose dos peptídeos, com o objetivo de verificar o efeito acumulado do composto testado e a sua liberação no SNC, ao longo do tempo de 6 horas.

Os animais foram colocados no rotarod e o tempo máximo de permanência no equipamento foi de 300s e o tempo mínimo de 1 s. A latência de queda dos animais foram contabilizadas em um total de 360 min, em intervalos de 0, 15, 30, 45, 90, 120, 150, 180, 210, 300, 360 min.

Para os animais tratados com o primeiro peptídeo Fraternina-24, observou-se uma diferença significativa nos diferentes tratamentos [Two-way ANOVA: $F_{(6,496)} = 6.236$; $p < 0,0001$] em relação ao grupo veículo e entre o grupo L-DOPA e o grupo 6-OHDA, nos primeiros 60 minutos de análise da taxa de permanência. O pós-teste de comparação múltipla Tukey revelou que não houve diferenças significativas entre as doses do peptídeo Fraternina-24 (0,18 nmol, 1,8 nmol, 0,36 nmol, 3,6 nmol, 7,2 nmol) e o grupo 6-OHDA (Figura 19-A).

Para os animais tratados com o segundo peptídeo Fraternina-14, a análise de variância de medidas repetitivas de duas vias (*two-way* ANOVA) mostrou diferenças significativas em relação à interação tempo versus tratamento [$F_{(48,408)} = 2.043$; $p = 0.0001$] e ao longo do tempo [$F_{(12,408)} = 3.4791$; $p < 0,0001$]. No tempo de 15 minutos houve diferenças significativas entre o grupo controle 6-OHDA e a dose intermediária de 3,2 nmol ($p < 0,05$), já no tempo de 30 minutos as diferenças

significativas foram entre o grupo controle 6-OHDA e a maior dose de 6,4 nmol ($p < 0,0001$) e o grupo L-DOPA ($p < 0,05$). Diferentemente do ensaio anterior, os animais tratados com o peptídeo Fraternina-14 na dose de 3,2 nmol no tempo de 15 minutos e para a dose 6,4 nmol no tempo de 30 minutos apresentaram um maior tempo de permanência no equipamento, podendo estar ligado à redução da gravidade da descoordenação motora induzida nos animais por 6-OHDA (Figura 19-B).

Já para a avaliação no teste de permanência dos animais que receberam o peptídeo Fraternina-10, a análise (*two-way ANOVA*) mostrou diferenças significativas em relação à interação tempo versus tratamento [$F_{(48,444)} = 1.462$; $p = 0.0272$] e ao longo do tempo [$F_{(12,444)} = 5.349$; $p < 0,0001$]. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos [$F_{(4,37)} = 1.772$; $p = 0,1553$] (Figura 19-C).

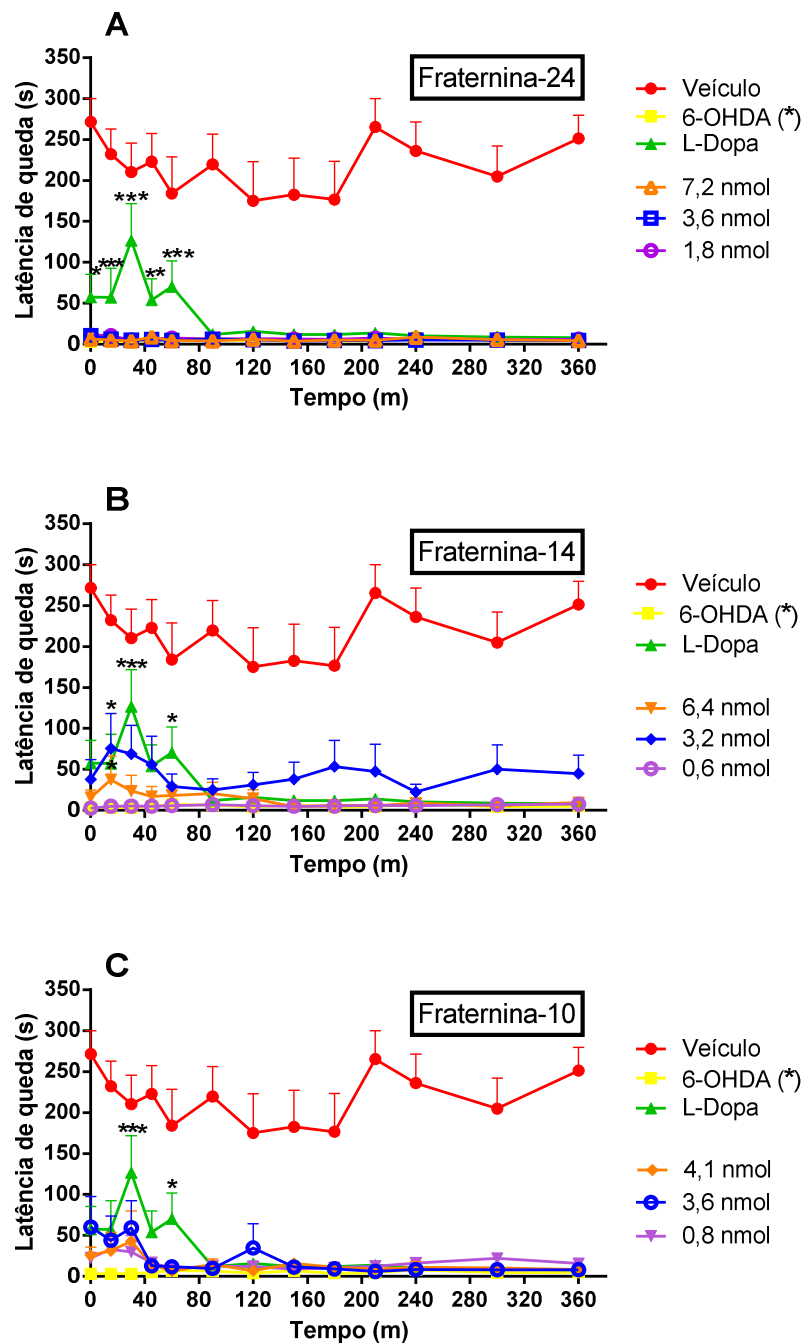


Figura 19: Efeito dos tratamentos no teste de permanência 6 horas. Tempo em segundos que os animais permaneceram no Rotarod em 13 avaliações diferentes após a lesão. Grupos controles: 6-OHDA (6-OHDA, n = 8) e grupo Veículo (veículo, n = 8) e grupo L-DOPA (L-DOPA, n = 8). Em A: peptídeo Fraternalina-24 (7,2 nmol (n=8), 3,6 nmol (n=9), 0,36 nmol (n=5), 1,8 nmol (n=5), 0,18 nmol (n=8)). Em B: Fraternalina-14 (6,4 nmol (n=8), 3,2 nmol (n=7), 0,6 nmol (n=8)). Em C: Fraternalina-10 (8,3 nmol (n=8), 4,1 nmol (n=8), 0,8 nmol (n=10)). Tratamentos com diferenças significativas * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle 6-OHDA.

4.4 EFEITO DOS TRATAMENTOS NA AVALIAÇÃO DA NEUROTOXICIDADE DOS PEPTÍDEOS

Com a finalidade de verificar o efeito neurotóxico do peptídeo Fraternina-24, Fraternina-14 e Fraternina-10 em induzir descoordenação motora nos animais, os compostos foram administrados nas mesmas doses e seguindo os mesmos esquemas de tratamento, sem a indução da lesão por 6-OHDA. Desta forma, os camundongos foram submetidos a um procedimento cirúrgico similar ao de indução de parkinsonismo, porém ao invés do composto neurotóxico 6-OHDA, os animais receberam a injeção intraestriatal de uma solução veículo composta por ácido ascórbico 0,2% e água deionizada Milli-Q.

Com relação aos animais que receberam o peptídeo Fraternina-24, as doses de 1,8 nmol e 3,6 nmol, com exceção do tempo de 180 minutos, produziram uma leve descoordenação motora quando comparado ao grupo veículo, exibindo um menor tempo de permanência no rotarod. Porém, os animais avaliados com a maior dose de 7,2 nmol, exibiram uma menor taxa de desempenho motor com uma diferença significativa em relação ao grupo veículo, evidenciando uma possível ação neurotóxica do peptídeo Fraternina-24. O teste ANOVA de duas vias revelou diferenças entre os tratamentos [$F_{(4,20)} = 17,53$; $p < 0,0001$] e na interação tratamento versus tempo [$F_{(12,240)} = 3,457$; $p = 0,001$]. Acrescido a isso, o pós-teste Bonferroni revelou diferenças significativas na dose de 3,6 nmol no tempo de 180 minutos ($p < 0,01$) e na dose de 7,2 nmol para os tempos de 0' a 360 minutos ($p < 0,01$), excluindo os tempos de 45, 150 e 300 minutos, destacando a alta taxa de queda em relação ao grupo veículo (Figura 20-A).

No que se refere à taxa de permanência dos animais após a administração do peptídeo Fraternina-14, as diferenças significativas ocorreram em relação ao grupo tratado na dose de 6,4 nmol com o grupo veículo demonstrando uma possível interação do composto no favorecimento do descontrole motor e relevante queda dos animais. Porém, os animais avaliados na dose intermediária de 3,2 nmol e com a menor dose de 0,6 nmol apresentaram maior permanência no equipamento com um tempo de latência similar ao do grupo veículo e, portanto, foram considerados como animais que não obtiveram prejuízo na locomoção. O teste ANOVA de duas vias revelou diferenças entre os tratamentos [$F_{(4,26)} = 13,49$; $p < 0,0001$] e na interação tratamento versus tempo [$F_{(12,312)} = 1,024$; $p = 0,4264$]. O pós-teste Bonferroni revelou diferenças significativas entre a dose de 6,4 nmol do peptídeo Fraternina-14 em todos os tempos avaliados em relação ao grupo veículo, excluindo somente o tempo de 120 minutos (Figura 20-B).

De sobremodo, os animais que receberam a menor dose de 0,8 nmol do peptídeo Fraternina-10 apresentaram um desempenho motor similar quando comparados com os animais do grupo veículo. No entanto, os animais que receberam a maior dose de 8,3 nmol obtiveram prejuízos na performance motora. O teste ANOVA de duas vias revelou diferenças entre os tratamentos [$F_{(4,32)} = 9,987$; $p < 0,001$] e na interação tratamento versus tempo [$F_{(12,384)} = 2,583$; $p = 0,0026$]. O pós-teste Bonferroni revelou diferenças significativas na dose de 8,3 nmol nos tempos 90, 210, 300 e 360 minutos ($p < 0,01$) em relação ao grupo veículo (Figura 20-C). A taxa de queda para os animais tratados com a dose intermediária de 4,1 nmol e a menor dose de 0,6 nmol foi relativa, não diferindo em todos os tempos do grupo veículo. De modo geral, os dados revelaram um possível efeito tóxico locomotor ao

longo de 6 horas para todos os animais tratados com os peptídeos sintéticos nas maiores doses.

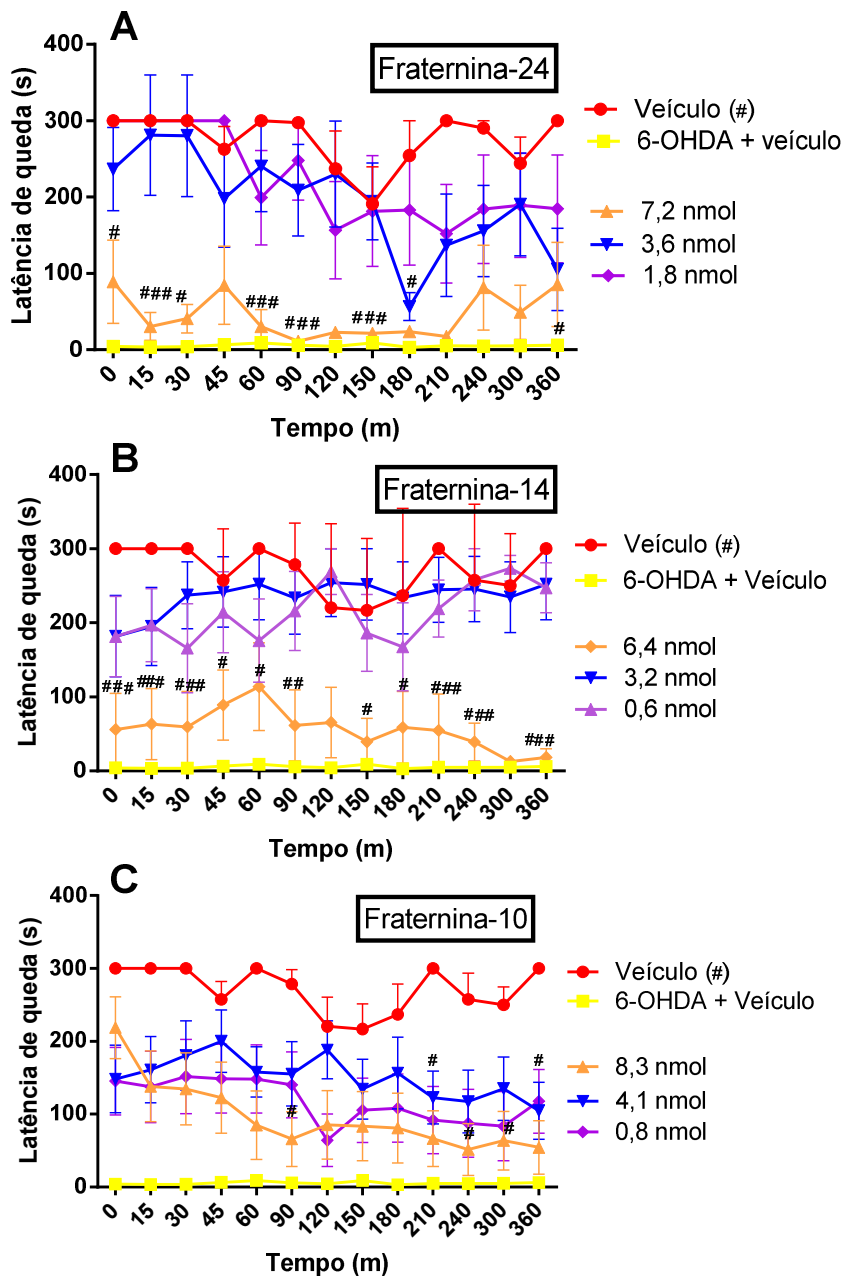


Figura 20: Efeito dos peptídeos sintéticos na avaliação da neurotoxicidade. Grupos controles: 6-OHDA (6-OHDA, n= 5) e grupo veículo (Veículo, n = 5). Em A: as doses do peptídeo Fraternina-24 foram: 7,2 nmol (n=5), 3,6 nmol (n=5), 1,8 nmol (n=5). Em B: as doses do peptídeo Fraternina-14 foram: 6,4 nmol (n=6), 3,2 nmol (n=6), 0,6 nmol (n=6). Em C: as doses do peptídeo Fraternina-10 foram: 8,3 nmol (n=8), 4,1 nmol (n=8), 0,8 nmol (n=6). Tratamentos com diferenças significativas # (p < 0,01), em relação ao Veículo e * (p < 0,01) em relação ao grupo L-DOPA.

4.5 EFEITO DOS TRATAMENTOS NO COMPORTAMENTO ROTATÓRIO APÓS DESAFIO COM A POMORFINA

No sexto dia após a lesão por 6-OHDA, foram avaliados os efeitos dos tratamentos no comportamento rotatório dos animais tratados com os peptídeos sintéticos e nos grupos controles. Para todos os ensaios, os animais pertencentes ao grupo veículo, não apresentaram nenhum comportamento rotatório, enquanto que os animais do grupo 6-OHDA apresentaram um elevado número de rotações contralaterais quando desafiado com o agonista dopaminérgico apomorfina. Ademais, os animais tratados com o fármaco L-DOPA apresentaram um maior número de giros quando comparado ao tratamento com os peptídeos e ao grupo 6-OHDA.

O teste ANOVA de uma via mostrou diferenças significativas em relação ao número de rotações contralaterais entre os tratamentos [$F_{(5,38)} = 6,889$; $p = 0,0001$] para o peptídeo Fraternina-24. Todos os animais tratados com as diferentes doses (7,2, 3,6 e 1,8 nmol) apresentaram um menor número de rotações quando comparado com o grupo 6-OHDA e L-DOPA. O teste de comparação múltipla Newman-Keuls verificou que a dose de 7,2 nmol foi significativamente diferente do grupo controle 6-OHDA e do grupo tratamento padrão L-DOPA ($p < 0,05$) (Figura 21-A).

Já o grupo de animais tratados com o peptídeo Fraternina-14 em todas as doses avaliadas (6,4 nmol, 3,2 nmol e 1,8 nmol) apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo tratamento L-DOPA ($p < 0,05$). O teste ANOVA de uma via mostrou diferenças significativas em relação ao número de rotações contralaterais entre os tratamentos [$F_{(5,38)} = 7.564$; $p < 0,0001$] seguido pelo pós teste

de comparação múltipla Newman-Keuls. O grupo que apresentou um número menor de rotações contralaterais foram os animais tratados com a dose de 1,8 nmol em que as diferenças significativas com o grupo controle 6-OHDA ($p < 0,01$) e com o grupo L-DOPA ($p < 0,01$) foram relevantes. A dose intermediária de 3,2 nmol e a maior dose 6,4 nmol demonstraram significância somente com o grupo L-DOPA ($p < 0,05$) (Figura 21-B).

O teste ANOVA de uma via demonstrou que para os animais tratados com o peptídeo Fraternina-10, [$F_{(5,40)} = 7.745$; $p < 0,0001$], o número de giros quantificados foi significativo somente para os animais tratados com a menor dose de 0,8 nmol ($p < 0,01$) (Figura 21-C).

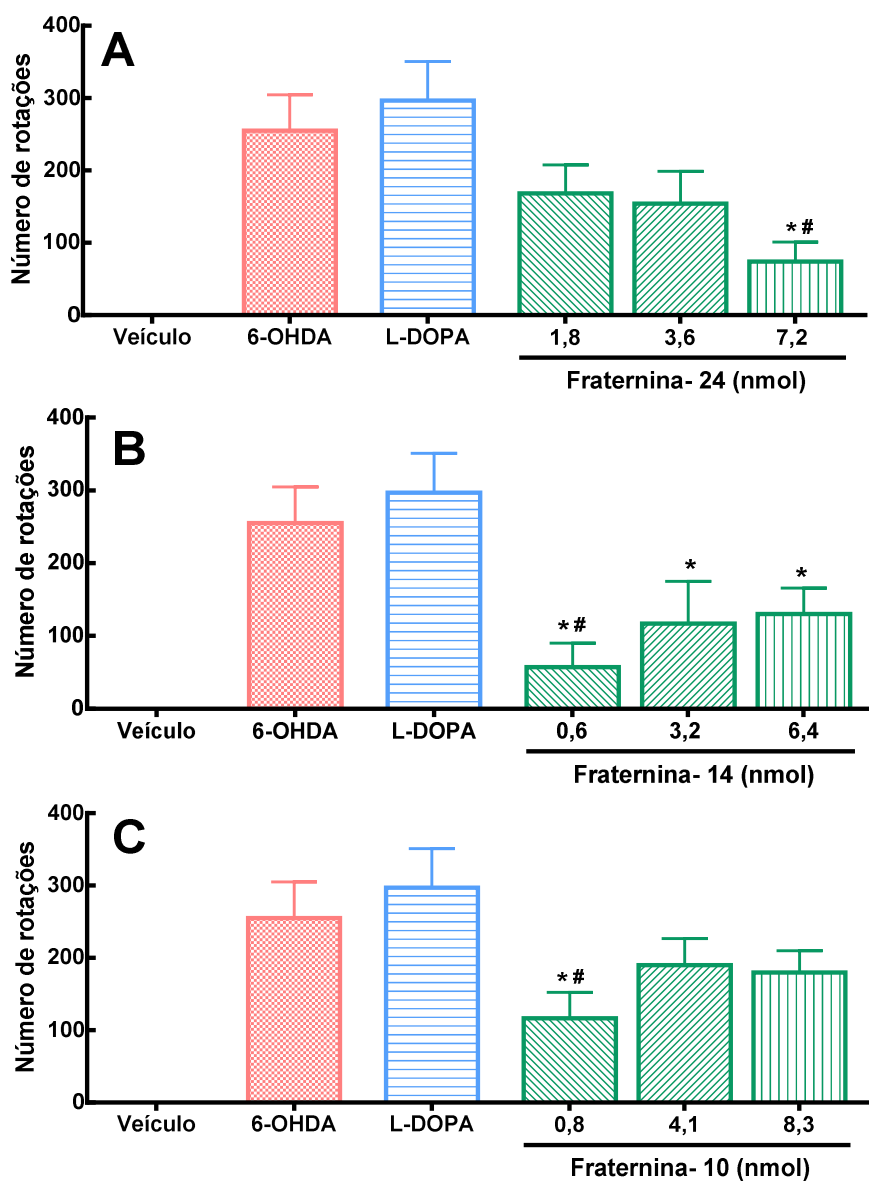


Figura 21: Comportamento rotatório após desafio com apomorfina (agonista dopaminérgico) injetado por via s.c. (5 μ g/animal) em camundongos previamente injuriados com 6-OHDA. Grupos controles: 6-OHDA (6-OHDA, n= 8), grupo Veículo (veículo, n = 8) e tratamento (L-DOPA, n=8). Em A: as doses do peptídeo Fraternalina-24 foram: 7,2 nmol (n=6), 3,6 nmol (n=9), 1,8 nmol (n=8). Em B: as doses do peptídeo Fraternalina-14 foram: 0,6 nmol (n=10), 3,2 nmol (n=6), 0,6 nmol (n=7). Em C: as doses do peptídeo Fraternalina-10 foram: 8,3 nmol (n=8), 4,1 nmol (n=6), 0,8 nmol (n=10). Tratamentos com diferenças significativas # (p < 0,01), em relação a 6-OHDA e * (p <0,01) em relação ao grupo L-DOPA.

4.6 AVALIAÇÃO DOS NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS VIÁVEIS NA REGIÃO DA SUBSTÂNCIA NEGRA

A determinação de neurônios dopaminérgicos presentes na região da SN do lado lesado foi realizada considerando o lado sadio do corte como 100%. A proporção de neurônios reativos a enzima TH foi detectada pela técnica de imunofluorescência em fatias cerebrais onde cada neurônio dopaminérgico emite uma coloração citoplasmática (corpos celulares) em verde e outra coloração nuclear em azul (Figura 23).

As análises das quantificações em fatias cerebrais demonstraram que os animais tratados com o peptídeo Fraternina-24 foram relevantes para os tratamentos na dose intermediária de 3,6 nmol e na maior dose de 7,2 nmol. De acordo com a análise (ANOVA de uma via) houve uma diferença significativa entre a porcentagem de neurônios nos diferentes tratamentos [$F_{(5,32)} = 10,24$; $p < 0,0001$]. O teste de comparação múltipla Tukey demonstrou que o grupo controle 6-OHDA apresentou uma redução significativa neuronal quando comparado ao grupo controle veículo ($p < 0,001$). Mais especificamente, para a dose de 7,2 nmol houve uma maior porcentagem de neurônios, em relação ao grupo ao grupo 6-OHDA ($p < 0,01$), demonstrando uma substancial similaridade com o grupo veículo (sadio) e com o grupo L-DOPA em que há um número maior de neurônios dopaminérgicos. No que se refere à dose intermediária de 3,6 nmol ocorreu uma diferença significativa não somente com o grupo controle 6-OHDA ($p < 0,01$), mas também, com o grupo tratamento padrão para a DP, L-DOPA ($p < 0,05$) (Figura 22-A).

Diferentemente, para os animais tratados com o peptídeo Fraternina-14 e Fraternina-10, a análise (ANOVA de uma via) não demonstrou diferenças

significativas na quantificação de neurônios em nenhum dos tratamentos utilizados. Tratamento com o peptídeo Fraternina-14, [$F_{(5,37)} = 15,38$; $p < 0,001$) e Fraternina-10, [$F_{(5,39)} = 5,39$; $p = 0,0004$] (Figura 22-B e C).

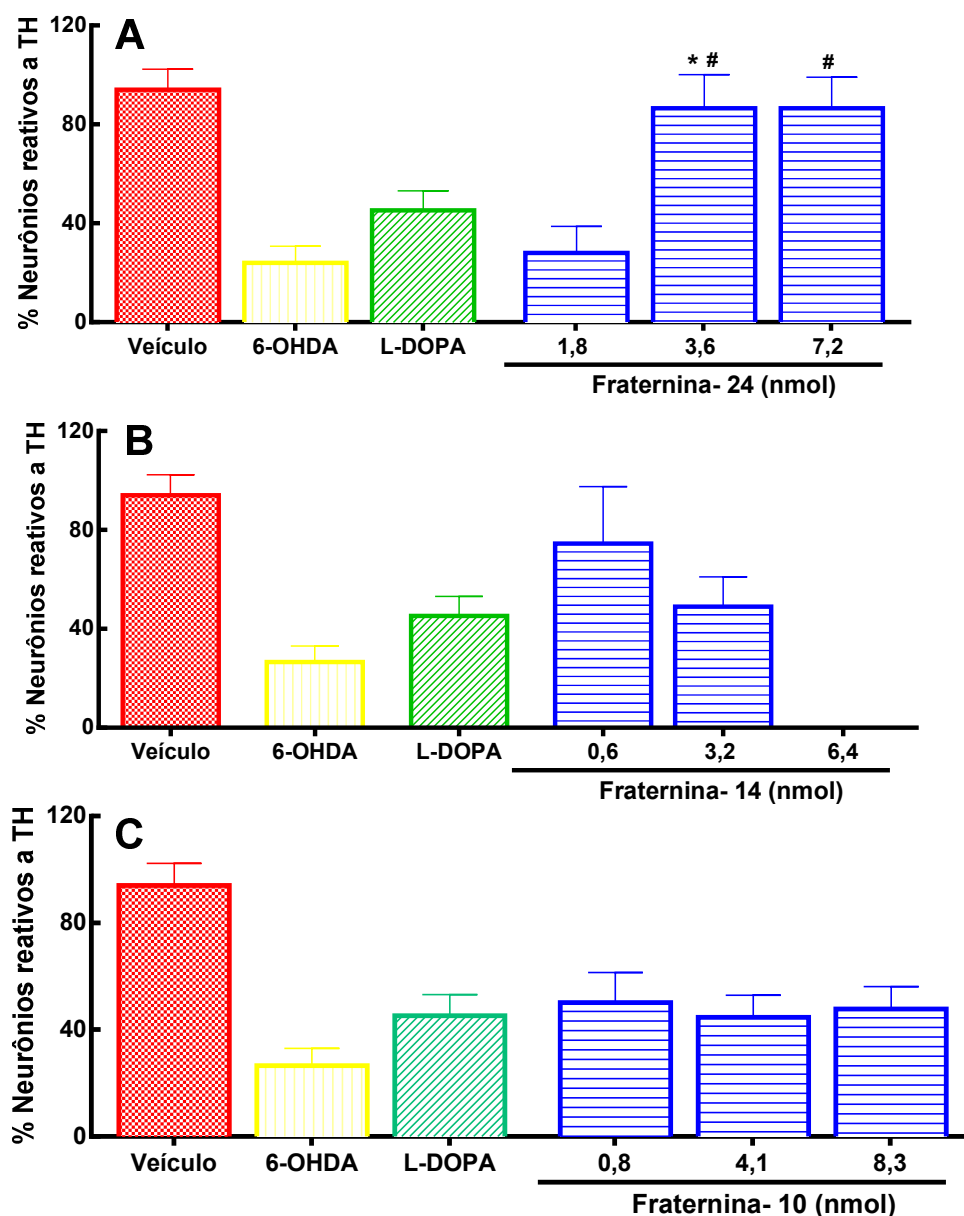


Figura 22: Determinação pela porcentagem de neurônios dopaminérgicos viáveis imunoreativos a TH em fatias cerebrais da região SN. Grupos controles: 6-OHDA (6-OHDA, n= 8), Veículo (veículo, n = 6) e tratamento com L-DOPA/ Benserazida (n=8). Em A: as doses do peptídeo Fraternalina-24 foram: 7,2 nmol (n=6), 3,6 nmol (n=7), 1,8 nmol (n=6). Em B: as doses do peptídeo Fraternalina-14 foram: 6,4 nmol (n=7), 3,2 nmol (n=9), 0,6 nmol (n=6). Em C: as doses do peptídeo Fraternalina-10 foram: 8,3 nmol (n=7), 4,1 nmol (n=8), 0,8 nmol (n=8). Tratamentos com diferenças significativas # ($p < 0,01$), em relação a 6-OHDA e * ($p < 0,05$) em relação ao grupo L-DOPA.

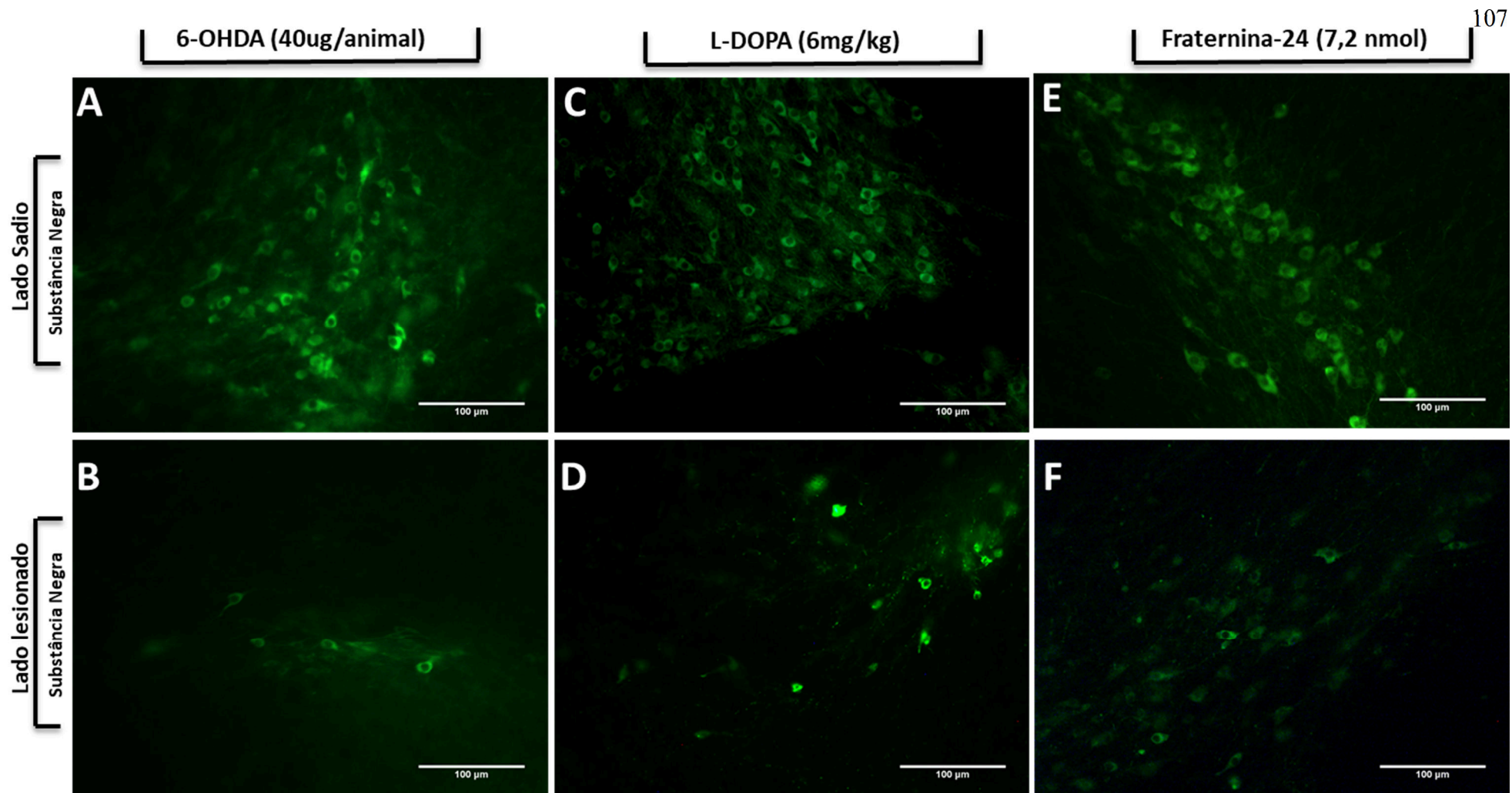


Figura 23: Imagem representativa com marcação dos neurônios dopaminérgicos reativos a enzima TH. A: Grupo 6-OHDA (40ug/animal) do lado veículo e em B neurônios imunomarcados do lado lesionado; C: Grupo L-DOPA (6mg/kg) com a imagem do lado sadio e em D do lado lesionado; E: Grupo tratamento Fraternalina-24 na dose de 7,2 nmol do lado veículo e em F do lado lesionado. Neurônios dopaminérgicos da SN imunomarcadas em verde no aumento de 20X.

4.7 DOSAGEM DAS CITOCINAS IL-1B, IL-6 E TNF-A

Os testes de padronização da quantificação das citocinas demonstraram que não houve diferenças significativas entre os dois hemisférios cerebrais, o que pode indicar que a liberação dos mediadores inflamatórios se mantém constante em ambos os hemisférios cerebrais (dados não informados). A partir disso, os experimentos foram efetuados com a utilização de todo o cérebro dos animais, o que denotou uma maior quantidade de macerado cerebral.

O conteúdo de IL-1 β , IL-6 e TNF- α foi quantificado pelo método de ELISA em extrato de tecido cerebral. Não houve diferenças significativas dos tratamentos em relação ao grupo controle 6-OHDA na quantificação das citocinas pro-inflamatórias IL-1 β e IL-6 (Figura 23-A, B e C). O teste ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas em o grupo 6-OHDA e o grupo veículo, em (A) IL-1 β [F(4,17)= 4,838; p=0,00086], em (B) IL-6 [F(4,14)= 5,742; p=0,01] e em (C) TNF- α [F(4,15)= 7,687; p=0,0014]. O pós-de comparações múltiplas Tukey evidenciou uma diminuição significativa da quantificação para a citocina TNF- α em (C) após tratamento com o peptídeo Fraternina-24, na dose de 7,2 nmol (p<0,05).

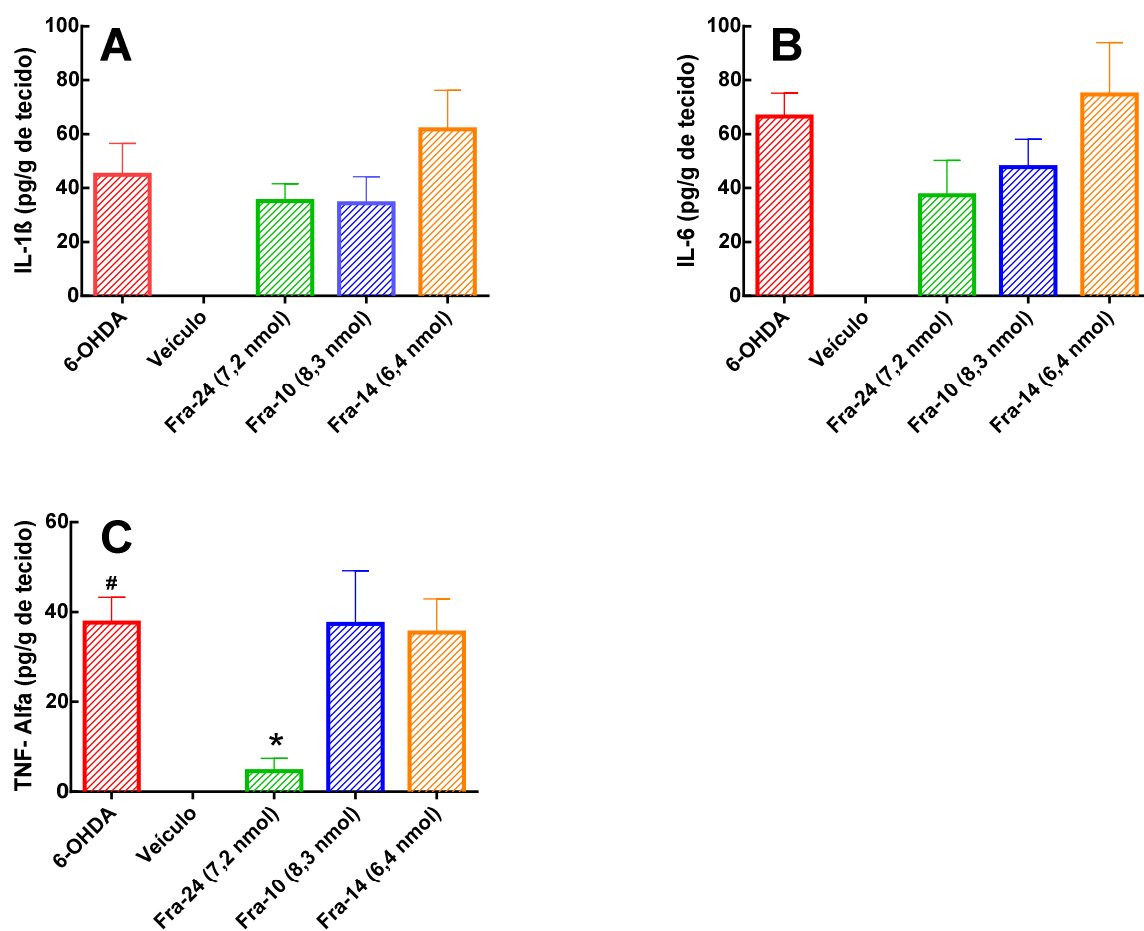


Figura 24: Efeitos dos peptídeos Fraternalina-24, Fraternalina-10 e Fraternalina-14 nos fatores de inflamação no modelo murino da DP. As concentrações de (A) IL-1 β , (B) IL-6 e (C) TNF- α do encéfalo de todos os animais experimentais nas maiores doses foram testadas, n=4-5. Os dados são mostrados como média \pm SEM. # (p <0,05) em relação ao grupo veículo e * (p <0,05) em relação ao grupo 6-OHDA + Veículo).

4.8 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Avaliou-se a atividade hemolítica dos peptídeos Fraternina-24, Fraternina-14 e Fraternina-10 individualmente em concentrações de 0.5 mM a 0.2 nM, como controle de 100% de hemólise foi utilizado Triton X-100. Observou-se a partir disso, que nenhum dos peptídeos avaliados apresentou hemólise nas diferentes concentrações testadas.

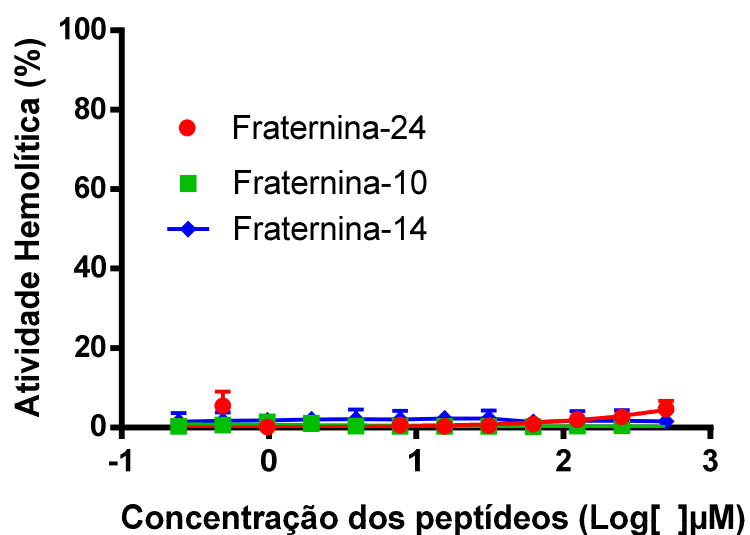


Figura 25: Ensaio de hemólise de eritrócitos de sangue de camundongos (Swiss) machos causados pelos peptídeos Fraternina-24, Fraternina-14 e Fraternina-10.

4.9 AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO

4.9.1 Efeito dos peptídeos Fraternina-24, Fraternina-10 sobre a ligação a receptores de [3H]-L-Glutamato

Na tentativa de caracterizar os possíveis alvos farmacológicos dos peptídeos estudados, foi avaliada a atividade de diferentes concentrações dos compostos sobre a ligação a receptores de [3H]-L-Glutamato. Os resultados obtidos dos testes *in vitro* demonstraram que os peptídeos Fraternina-24 e Fraternina-10 não apresentaram competição com [3H]-L-Glutamato nos ensaios de ligação aos seus receptores quando, avaliados em 6 concentrações crescentes do peptídeo (Figura 24). Portanto, pode-se inferir que este composto não esteja agindo de forma competitiva ao glutamato liberado fisiologicamente, podendo estar atuando e impedindo a ativação de outras vias de morte neural.

Diante disso, não foram realizados testes de captação com o último peptídeo Fraternina-14, por presumir que este também não atue por este mesmo mecanismo. Conseqüentemente, outros ensaios com o *in vitro* foram realizados com esses compostos na busca de encontrar o mecanismo de ação dessas moléculas no SNC.

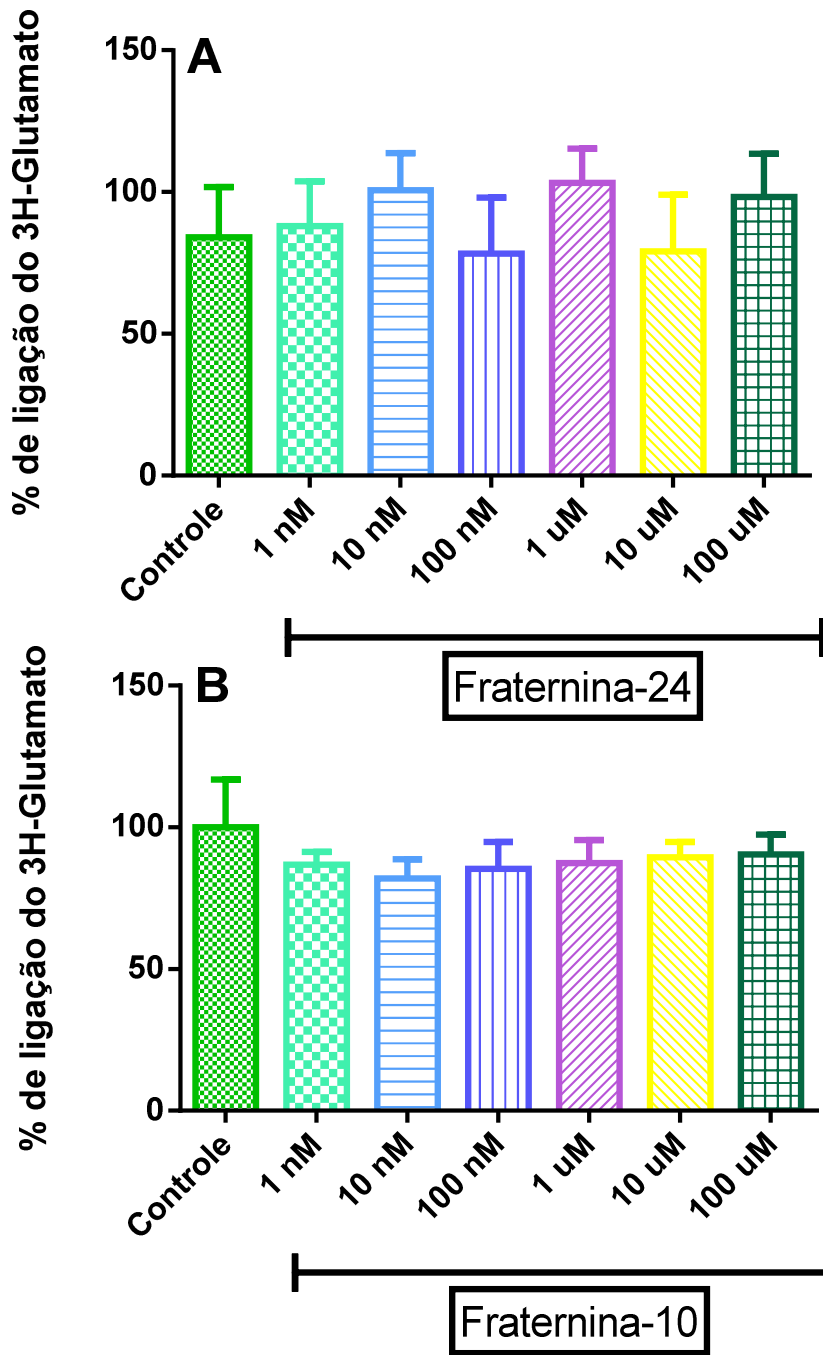


Figura 26: Histograma demonstrando os efeitos de concentrações crescentes dos peptídeos sintéticos Fraternalina-24 (10 a 1000 nmol) e Fraternalina-10 (10 a 1000 nmol) na ligação de $[^3\text{H}]$ -L-Glutamato a seus receptores. Os dados são apresentados em porcentagem do controle como média \pm EPM de 3 experimentos em triplicata.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Um grande interesse tem emergido para ampliar o conhecimento dos efeitos biológicos de toxinas peptídicas advindas da peçonha de himenópteros, uma vez que 70% da peçonha bruta é composta por peptídeos bioativos (PALMA, 2011). Em especial, a peçonha de vespas sociais da família Vespidae tem recebido grande atenção, e para este trabalho, como objeto de estudo, peptídeos sintéticos foram desenhados a partir de compostos derivados da peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus*. O interesse em elucidar os componentes presentes na peçonha desta espécie de vespa surgiu devido ao efeito paralisante de sua peçonha ao tornar a presa imóvel durante o forrageamento, indicando assim, a presença de compostos neuroativos (MATEUS, 2005).

A partir de estudos previamente realizados pelo grupo de Neurofarmacologia da UnB, isolou-se um composto, que após o seu sequenciamento e a comparação com outros peptídeos já descritos tratava-se de um novo peptídeo, com massa molecular de 2748,50 Da. Os ensaios biológicos realizados com o composto selvagem Fraternina revelaram o seu grande potencial neuroprotetor em um modelo murino da DP (BIOLCHI, 2014).

Neste sentido, diante do grande potencial antiparkinsoniano, foi realizado o desenho e a síntese química para a avaliação biológica de outros 3 peptídeos derivados do peptídeo selvagem Fraternina, todos com alterações em sua sequência primária. Os novos compostos foram denominados de Fraternina-24, Fraternina-14 e Fraternina-10 por possuírem 24, 14 e 10 resíduos de aminoácidos, respectivamente.

As propostas de modificações realizadas a partir do composto selvagem *Fraternina* buscaram conservar a atividade neuroprotetora, assim como diminuir os efeitos adversos apresentados na avaliação da coordenação motora, e favorecer o aumento da escala de produção para a aplicabilidade industrial (UHLIG et al., 2014; EDWARDS et al., 2016).

Em face do exposto, buscas por similaridades em banco de dados com os peptídeos sintéticos desenhados foram realizadas, e verificaram-se semelhanças de 50% do peptídeo *Fraternina-24*, 64% do peptídeo *Fraternina-14* e 30% do peptídeo *Fraternina-10* com o peptídeo *Silverina*. O peptídeo *Silverina* foi isolado da peçonha da vespa *Protonectarina sylveirae* por Dohtsu e colaboradores em 1993. Segundo esses autores, a *Silverina* induz a liberação de histamina de mastócitos com uma diferença relevante em relação aos peptídeos mastoparanos (reconhecidamente como degranuladores de mastócitos), pois este composto não causa o rompimento celular. Os mastoparanos podem apresentar atividades hemolíticas como no caso do *Mastoparano-X* e do *Mastoparano-B*, isolado da peçonha da *Vespa xanthoptera* e da *Vespa basalis*, respectivamente (HO; HWANG, 1991). Interessantemente, os ensaios de hemólise de eritrócitos de sangue de camundongos (Swiss) machos causados pelos peptídeos *Fraternina-24*, *Fraternina-14* e *Fraternina-10*, (concentrações de 0.5 mM a 0.2 nM) não apresentaram atividade hemolítica.

Adicionalmente, as pontes dissulfeto intramoleculares são incomuns para as classes de toxinas peptídicas encontradas em vespas sociais, até hoje estudadas. Para estas classes, além da *Silverina*, apenas o peptídeo *Paulistine* isolado da peçonha da vespa *Polybia paulista* e com 21 resíduos de aminoácidos na sua sequência primária foi descrito com uma única ponte dissulfeto (GOMES et al., 2014). Outros compostos extraídos da peçonha de abelhas como a *Apamina*, a

Tertiapina e o peptídeo MCD foram descritos contendo pontes dissulfeto em sua sequência (MOURELLE et al., 2014; XU; NELSON, 1993).

Além da semelhança com a Silverina, o peptídeo Fraternina-24 não apresenta similaridade quando comparado com os peptídeos mais abundantemente encontrados na peçonha de vespas, como as cininas, os peptídeos quimiotáticos e os mastoparanos (PIEK, 1991; MENDES et al., 2004; MONTEIRO; ROMÃO; SOARES, 2009). Ao contrário do que já está evidenciado para os peptídeos extraídos da peçonha de outros animais como aranhas, escorpiões, serpentes e moluscos marinhos, cuja porcentagem de compostos é significativamente rica em pontes dissulfeto, em vespas essa ocorrência é rara (UEBERHEIDE et al., 2009). As pontes dissulfeto estão relacionadas com o correto enovelamento das estruturas, o que pode conferir uma maior interação com o sítio no receptor alvo e estar ligado a uma maior estabilidade da molécula (BULAJ, 2005).

Da mesma forma, foram identificadas similaridades com o peptídeo quimera GLP1-p114a, sendo que para a Fraternina- 24 correspondeu a 29%, a Fraternina-14 obteve 35% e a Fraternina-10 apresentou 50%. Swedberg e colaboradores (2016) realizaram a construção de uma série de combinações entre sequências peptídicas, o peptídeo GLP-1 ou exendina-4 e o peptídeo p114a. Essas combinações foram denominadas de truncamentos, tendo como resultado final uma molécula quimérica GLP1-p114a. Esta molécula apresenta um total de 39 resíduos de aminoácidos e 2 pontes de dissulfeto (SWEDBERG et al., 2016). Apesar do peptídeo Fraternina-24 apresentar uma ponte de dissulfeto em sua molécula, foi o peptídeo Fraternina-10 que obteve a maior de similaridade com peptídeo quimera GLP1-p114a (50%). Semelhantemente, Donnelly (2012) descreveu que os peptídeos exendina-4 e GLP-

1 compartilham 50% de identidade, e ambos os compostos Exenatida forma sintética da exendina-4 apresentam afinidade pelo mesmo alvo farmacológico, o receptor GLP-1R. Da mesma forma, o composto que apresentou maior similaridade com o peptídeo Exenatida foi o peptídeo linear Fraternalina-10 com 50%, seguido do peptídeo Fraternalina-24 que obteve 25%, no entanto, o peptídeo Fraternalina-14 não apresentou nenhuma similaridade.

É importante ressaltar, que as incretinas endógenas GLP-1 produzem um aumento não só da produção do AMPc, como também, exercem efeitos glicorregulatórios importantes no controle da insulina e do glucagon (CAMPBELL; DRUCKER, 2013). Além disso, estudos evidenciam a presença dos receptores GLP-1R no SNC, cujo efeito agonista consistiu na formação de novos neurônios e conexões sinápticas, além de reduzir a inflamação, o estresse oxidativo e os danos causados por morte celular programada (BERTILSSON et al., 2008; LI et al., 2016; CHANG et al., 2016; GULLO et al., 2017; IWAI et al., 2014; KIM et al., 2017). Diante disso, os agonistas dos receptores GLP-1R, Exendina-4 e o seu análogo sintético Exenatide tornaram-se ferramentas farmacológicas importantes para o tratamento da diabetes mellitus tipo 2 (DM2), e, mais recentemente, exercendo um efeito neuroprotetor em pacientes com a DP (ATHAUDA et al., 2017; AVILES-OLMOS et al., 2013a).

Em um estudo recente, Edwards e colaboradores (2016) investigaram alterações em peptídeos ricos em arginina, denominados de peptídeo R9 e verificaram a eficácia neuroprotetora. As modificações consistiram na acetilação e amidação da região N-terminal, sendo que após a amidação o peptídeo modificado teve sua atividade neuroprotetora ampliada em modelos de viabilidade celular e

excitotoxicidade glutamatérgica (EDWARDS et al., 2016). Adicionalmente, a acetilação na região N-terminal da cadeia peptídica diminui a carga líquida peptídica devido a mudanças positivas no grupamento N-terminal, já a amidação aumenta a carga líquida, o que proporciona maior estabilidade para a molécula e o aumento da resistência contra a ação de proteases já demonstrada, por exemplo, em modelos de Acidente Vascular Encefálico (AVE) (MELONI et al., 2015). Entretanto, efeitos divergentes podem ser verificados, como por exemplo, a diminuição da afinidade pelo receptor como o observado para o GPL-1 após a introdução do grupamento amina (DONNELLY, 2012).

Neste sentido, entende-se que as ações desempenhadas por moléculas peptídicas podem ser extremamente diversificadas (MORENO; GIRALT, 2015). Como por exemplo, podem exercer funções catalizadoras, as quais transportam e armazenam outras moléculas, ou podem fornecer apoio mecânico e proteção imunitária, ou aquelas que atuam nas sinapses transmitindo ou inibindo os impulsos nervosos como também controlando o crescimento e a diferenciação celular (MELO; CUNHA; FIALHO, 2012). E encontrar os possíveis alvos de interação farmacológica que essas moléculas desempenham foi uns dos principais objetivos deste estudo. Mas, graças aos métodos atuais de síntese química, síntese enzimática (ou biocatalisada) ou de síntese via DNA recombinante, os peptídeos extraídos de compostos naturais, podem ser passíveis de serem reproduzidos, e portanto, utilizados como ferramentas farmacológicas importantes no controle de doenças neurológicas (UHLIG et al., 2014). Logo, estes compostos chamados de sintéticos passaram a servir como provas inequívocas das identidades químicas e dos papéis biológicos desempenhados.

Diante disso, com o aumento do uso de peptídeos terapêuticos nas indústrias farmacêuticas, têm sobressaído questões importantes, como a estabilidade do composto durante o período de armazenamento e a liberação eficaz, no intuito de evitar a ocorrência de efeitos adversos indesejáveis (MELO; CUNHA; FIALHO, 2012). Por conseguinte, as alterações químicas controladas, como por exemplo, as substituições de aminoácidos, as acetilações, peguilações e os sistemas poliméricos podem desempenhar papéis importantes contra a degradação, aumentando a permeabilidade através das membranas, como também a liberação prolongada (MALIK et al., 2007).

No entanto, por apresentarem alta complexidade estrutural, pequenas modificações, como na posição dos aminoácidos podem acarretar, em termos funcionais, a perda da atividade, com respostas diferentes daquelas encontradas no composto natural (MACHADO et al., 2004). Portanto, as informações estruturais apresentadas pela predição de estruturas tridimensionais dos peptídeos sintéticos juntamente com as sequências peptídicas podem ser projetadas, com o propósito de encontrar a possível estrutura de interação e desempenho das ações, que podem ser confirmadas em modelo de testes animais.

Para tanto, a modelagem de estrutura tridimensional possibilita conhecer a estrutura do peptídeo, componente fundamental para a descoberta do mecanismo de ação, uma vez que os peptídeos com potenciais terapêuticos possuem de maneira geral conformações tridimensionais (MACHADO et al., 2004). Essas conformações podem conter estruturas secundárias, terciárias e quaternárias com grupamentos e ligações químicas relevantes na interação chave com os seus receptores (SINHA; TREHAN, 2003). Com base nisso, o primeiro modelo utilizado foi

a partir do método Threading desenvolvido pelo servidor *I-Tasser* (Iterative Threading Assembly Refinement) <<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>> (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010), que identifica o padrão de enovelamento dos peptídeos com a aplicação da modelagem por homologia em comparação ao de estruturas de peptídeos já caracterizadas anteriormente. O segundo modelo tem a finalidade de prever a estrutura tridimensional dos peptídeos e como eles estão dispersos espacialmente. Para isso foi utilizado o *Método de novo* realizado pelo servidor *QUARK* <<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/QUARK/>> (XU; ZHANG, 2012), que não utiliza moldes de proteínas semelhantes. Esta predição é realizada a partir da sequência de aminoácidos fornecida em comparação a informações provenientes de bancos de dados de estruturas de moléculas já anteriormente determinadas (Figura 17).

Desta maneira, todos os peptídeos estudados apresentaram uma estrutura em tipo alfa-hélice, sendo que o peptídeo *Fraternina-24* adota uma conformação secundária bem definida, com regiões de alta flexibilidade em ambos os modelos. O primeiro resíduo de cisteína encontra-se exatamente no meio da molécula e o segundo resíduo na última posição, sugerindo uma conformação parcialmente cíclica. Já para os peptídeos *Fraternina-14* e *Fraternina-10* o modelo com melhor valor obtido foi o realizado pelo servidor *I-Tasser*. Esse modelo revelou para a *Fraternina-14* uma região C-terminal sem estrutura secundária, com dois aminoácidos de cisteínas entre a posição 1 e a posição 14 da cadeia de aminoácidos, propondo a formação de uma ponte de dissulfeto com conformação totalmente cíclica. No entanto, para o peptídeo *Fraternina-10* é a região N-terminal que não apresenta a estrutura secundária definida, com ausência de aminoácidos de cisteína e com conformação linear (Figura 17-A).

A partir do banco de dados, foi realizada a comparação dos peptídeos estudados com as estruturas de outras moléculas já elucidadas que apresentaram a sequência igual ou similar. O modelo utilizado *I-Tasser* constrói por meio de uma escala de classificação, as 10 melhores sequências que serviram como base para a construção dos peptídeos avaliados. O molde número 1 da escala de classificação, por apresentar maior identidade, foi a molécula e escolhida e demonstrada neste estudo.

Portanto, o molde número 1 utilizado para a construção do modelo do peptídeo Fraternina-24 foi uma molécula quimérica, entre peptídeo 1 glucakon-like (GLP-1), exendina-4 e o peptídeo pl14a (α -conotoxina) (ARIAS; BLANTON, 2000; GALLWITZ, 2011; SWEDBERG et al., 2016). Os truncamentos realizados consistiram na inclusão da porção N-terminal do dos peptídeos GLP-1 ou enxendina-4 com a porção C-terminal do peptídeo α -conotoxina pl14a isolado do caramujo *Conus planorbis*. A resultante dessas combinações consistiram em uma molécula com 4 aminoácidos de cisteína e 2 pontes dissulfeto, sendo que uma dessas pontes demonstra a posição conservada em relação ao peptídeo Fraternina-24 (SWEDBERG et al., 2016) (Figura 17- G).

Interessantemente, o peptídeo Fraternina-24 compartilha de algumas propriedades com os peptídeos GPL-1 e exedina-4, pois ambos os compostos possuem a regiões N-terminais flexíveis, seguido por uma α -hélice. Porém, o peptídeo α -conotoxina pl14a, apresenta uma estrutura distinta de outras conotoxinas. Este contém 25 resíduos de aminoácidos, a região C-terminal amidado, duas pontes dissulfeto entre os aminoácidos 1-3 e 2-4 e estruturas secundárias formando hélices do tipo alfa (IMPERIAL et al., 2006). O peptídeo α -conotoxina pl14

apresentou atividade no sistema nervoso de mamíferos inibindo o canal K dependente de voltagem do subtipo Kv1.6 e receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR).

Gallwitz & colaboradores (2011) descrevem que as estruturas em α -hélice apresentadas pelos peptídeos GPL-1 e Exendina-4 são importantes para a ligação e sinalização em seu receptor. Mutações ou alterações na região C-terminal podem resultar em uma perda ou redução da helicidade e desta forma alterar a eficácia do composto.

A partir desses estudos, foi identificado a região considerada importante para a interação com os receptores GLP-1R, sendo que a região encontrava-se na região C-terminal, e o aminoácido chave foi a fenilalanina (Phe) na posição 22 do peptídeo quimérico (Swedberg et al., 2016). A posição da Phe nessa quimera pode ser considerada similar ao peptídeo Fraternina-24, que também possui um aminoácido Phe localizado na região C-terminal da molécula, contudo na posição 23. Tais propriedades compartilhadas podem demonstrar semelhanças significativas para o conhecimento do mecanismo de ação exercido pelo peptídeo Fraternina-24.

Para o peptídeo Fraternina-14, o molde número 1 da escala foi uma toxina MMP23 (matrix metaloproteinase 23) pertencente a uma grande família de endopeptidases. Com 37 resíduos de aminoácidos, a toxina MMP23 possui ações modulatórias de canais de potássio (GALEA et al., 2014; NGUYEN et al., 2013). Além disso, as MMPs (metaloproteinases) podem atuar na degradação de proteínas da matriz extracelular, liberação de ligantes apoptóticos, ativação de quimiocinas e citocinas (RODRÍGUEZ; MORRISON; OVERALL, 2010; VU; WERB, 2000). E conseqüentemente, a MMPs também estão envolvidas em várias desordens

neurodegenerativas, incluindo a Doença de Alzheimer, a Doença de Parkinson e a Isquemia Cerebral (KIM; JOH, 2012; SHIN et al., 2012) (Figura 17-I).

Interessantemente, Nuyen e colaboradores (2013), descrevem um membro da família das metaloproteases com um domínio cuja a arquitetura e função apresenta-se distintas das demais MMPs. A MMP23 contém um domínio (MMP23TxD) que está evolutivamente relacionado ao das toxinas peptídicas extraídas de anêmonas do mar (SHIOMI, 2009). A função desempenhada pela toxina MMP23 foi a de modulação da atividade dos canais de potássio voltagem dependente do tipo Kv1, regulando assim, o tráfego para o meio intracelular por estes canais (NGUYEN et al., 2013). Ademais, o domínio semelhante à toxina MMP23 pode bloquear o poro dos canais (Kv1.3), e desempenhar uma papel importante na diminuição da ativação neuronal. Por conseguinte, já está bem fundamentado, que as anormalidades na movimentação desses íons podem levar a uma excitabilidade celular intrínseca, como identificado na Epilepsia e em outras desordens neurológicas (RANGARAJU et al., 2010).

É importante ressaltar que mais estudos são necessários para a avaliação da interação do peptídeo Fraternina-14 com os canais de potássio voltagem dependente. E assim descobrir se o composto desempenha a mesma função das MMP23, diminuindo a excitabilidade celular e preservando os neurônios envolvidos na DP.

Diferentemente, para o peptídeo Fraternina-10 o molde número 1 utilizado foi uma proteína p9 do vírus da anemia infecciosa equina (VAIE). A proteína p9 do VAIE é causada por um lentivírus, da família Retroviridae, com três genes principais *gag*. Esses genes codificam as proteínas estruturais utilizadas para a replicação viral no

hospedeiro chamadas de p26 (capsídeo), p15 (transmembrana), p11 e p9 (nucleocapsídeo) (Wang, Xue-Feng, 2018). A proteína molde p9 é a região responsável por conter o ácido nucleico e a cápsula de proteína (CRAIGO; MONTELARO, 2013). Desta maneira, a proteína p9 do VAIE utilizada como molde não apresentou função que pode ser correlacionada com efeitos produzidos pelo peptídeo Fraternina-10 *in vivo* que possa estar concernente com a atividade desempenhada neste trabalho (Figura 17-E,H).

Com o propósito de avaliar os efeitos neuroprotetores de novos compostos terapêuticos e de identificar os alvos farmacológicos que levam a proteção dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, tem-se utilizado o modelo animal pela infusão de 6-Hidroxidopamina (6-OHDA) em uma região específica do SNC, o que causa a neurodegeneração seletiva desses neurônios (HIRSCH et al., 2003). A 6-OHDA é uma neurotoxina seletiva de neurônios catecolaminérgicos da via nigroestriatal, primeiramente testada em ratos (UNGERSTEDT, 1968). Para que ocorra a correta reprodução das características fisiopatológicas apresentadas pelas pessoas que possuem a DP, a infusão de 6-OHDA deve ocorrer na forma de injeção unilateral, diretamente no SNC, pois essa toxina não é capaz de atravessar a Barreira Hematoencefálica (BHE) (BOVÉ; PERIER, 2012).

Nesse contexto, há 3 regiões possíveis para que se realize a infusão de 6-OHDA. A região da Substância negra (SN), local onde estão localizados os corpos dos neurônios dopaminérgicos; o feixe prosencefálico medial (FPM), onde se encontram os axônios desses neurônios ou o estriado (ES), onde se encontram as terminações nervosas dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais e provoca uma progressiva destruição retrógrada (BLANDINI; ARMENTERO, 2012; DEUMENS; BLOKLAND; PRICKAERTS, 2002). Dependendo do local da injeção, como o que

acontece quando a toxina é injetada na região do ES, a lesão neuronal pode ser avaliada ao longo de até quatro semanas, e, portanto, utilizada para mimetizar a progressão crônica da DP (ALVAREZ-FISCHER et al., 2008; SHIMOHAMA et al., 2003). Nos locais como a SN e no FPM, os níveis de dopamina estriatal reduzem drasticamente em cerca de 90% (MEREDITH; SONSALLA; CHESSELET, 2008).

Essa massiva destruição neuronal ocasionada pela neurotoxina, promove em conjunto a eliminação seletiva de dois principais sistemas dopaminérgicos do cérebro; o sistema mesolímbico e o sistema nigroestriatal, cujo tempo de degeneração neuronal é alcançado em 2 ou 3 dias (PRZEDBORSKI, 2005). O mecanismo de depleção neuronal causada pela toxina 6-OHDA resulta na disfunção mitocondrial e morte celular por apoptose. A 6-OHDA é captada para a região do corpo celular através de transportador do tipo DAT onde é catalizada pela enzima MAO-B (SHIMOHAMA et al., 2003). Por esta razão, este modelo torna-se importante ferramenta de estudo, pois além de mimetizar a forma progressiva da doença, o que pode ser verificado por meio de testes de melhora da locomoção motora e pela determinação da depleção de dopamina, permite com que seja realizado a comparação entre o lado injuriado com o lado veículo de um mesmo animal, proporcionado assim uma maior confiabilidade dos estudos (FRANCARDO et al., 2011a).

Fundamentado nisso, os resultados do presente trabalho mostraram que o composto neurotóxico 6-OHDA foi capaz de induzir alterações no comportamento locomotor verificado pelos grupos controles nos testes de avaliação da coordenação motora (48h, 72h, 96 horas), permanência de 6 horas e no desafio com apomorfina. Todos os animais lesionados por 6-OHDA apresentaram alterações significativas em

relação ao grupo veículo. Por consequência, pode-se inferir que a indução da DP pelo modelo de infusão intraestrial de 6-OHDA mostrou-se eficiente em causar alterações motoras nos animais e morte de neurônios dopaminérgicos da SN. Vale ressaltar, que o protocolo de avaliação do efeito neuroprotetor dos peptídeos sintéticos consistiram em 3 injeções *i.c.v.* que se iniciaram exatamente 60 minutos após a neurocirurgia, no segundo e no quarto dia após o insulto, sempre no mesmo horário.

A avaliação da descoordenação motora utilizando o equipamento rotarod trata-se de um procedimento seguro e eficiente, em que o tempo que o animal permanece na barra giratória é determinado como “tempo de latência”. Este método avalia fatores envolvidos na função motora como: o equilíbrio dinâmico; a coordenação motora; o planejamento motor; a aprendizagem motora e as condições físicas gerais (PINTO; KO, 2012). Para tanto, o treinamento realizado um dia antes da neurocirurgia procura identificar as condições de aprendizagem motora e as condições físicas necessárias para a pesquisa. Pois, as alterações de desempenho motor por inexistência da aprendizagem e na memória espacial encontram-se significativamente associadas às disfunções na via nigroestriatal e na neurotransmissão dopaminérgica (AYTON et al., 2013; SHIOTSUKI et al., 2010). Portanto, os níveis de resultados obtidos pela avaliação da coordenação motora apontam acometimento de estruturas importantes do sistema motor; como a SNpc, globo pálido, córtex motor e o estriado (LALONDE; STRAZIELLE, 2007).

Com a finalidade de identificar a melhora da atividade locomotora induzida pelos compostos sintéticos, foi realizado o primeiro teste de coordenação motora no rotarod (48h, 72h, 96 horas) a partir do segundo dia após a lesão. Os dados obtidos no presente estudo demonstraram que não houve uma melhora relevante do

comportamento motor apresentado pelos animais em nenhuma das doses testadas durante os tratamentos com os peptídeos sintéticos. Foi verificado, somente, um aumento no tempo de permanência nos tempos de 48 e 72 horas após a lesão para os animais tratados com o peptídeo Fraternina-10.

O segundo teste, chamado de teste de permanência que teve a duração de 6 horas foi realizado após a administração da terceira dose dos peptídeos sintéticos. Os animais tratados com a dose intermediária de 3,2 nmol e com a maior dose de 6,4 nmol do peptídeo Fraternina-14 apresentaram uma redução da latência de queda nos tempos de 15 e 30 minutos após a terceira dose, além do grupo controle positivo chamado de grupo L-DOPA. O desgaste físico possivelmente sofrido em um teste longo como o de permanência por 6 horas pode ser levado em consideração para a justificativa das quedas rápidas e com um menor tempo de latência dos animais avaliados. Porém, estudos descrevem que o equipamento rotarod foi projetado especificamente para realizar medidas automatizadas, que avaliam déficits neurológicos em roedores, e que as quedas não estão relacionadas ao próprio desgaste físico dos animais, mas sim, a as alterações da capacidade motora (BROOKS; DUNNETT, 2009; PINTO; KO, 2012). Desta maneira, a alta taxa queda demonstrada pelos animais tratados com os peptídeos sintéticos pode ser considerada uma reação adversa, comportamento já demonstrado na clínica pelo fármaco antiparkinsoniano L-DOPA. Preconiza-se que os efeitos tóxicos produzidos podem estar relacionados à retirada o grupamento carboxílico e a alteração dos aminoácidos Lys e Gln, que possivelmente, podem influenciar na conformação peptídica e/ou na estrutura de interação.

A administração de L-DOPA associado à benzerazida é uma das principais formas de tratamento atual para pacientes com a DP (HAUSER; ELLENBOGEN; KHANNA, 2018). Neste estudo, pode-se perceber que os animais previamente lesionados e tratados por *i.p* com a L-DOPA apresentaram uma melhora inicial da disfunção motora induzida pela 6-OHDA no teste de permanência de 6 horas (Figura 19). De acordo com o descrito por Li e Zhou (2013), para que não sofra uma rápida degradação da L-DOPA, quando administrada por via oral, é necessário que esta seja realizada em conjunto com outro composto capaz de inibir a sua metabolização periférica, chamado de Inibidor da Dopa Descarboxilase (Benzerazida), permitindo assim que o precursor metabólico da dopamina (L-DOPA) atravesse a barreira hematoencefálica e alcance as áreas cerebrais envolvidas com a DP. E para que ocorra uma correta administração do composto, similar ao que acontece na clínica, duas doses diárias no turno matutino e vespertino foram administradas durante o protocolo do estudo, ou seja, um total de 9 doses, como já descrito por Li e Zhou (2013).

Estudos farmacológicos descrevem que a L-DOPA após ser rapidamente convertida no neurotransmissor dopamina pode levar a uma restauração muito rápida da função motora, resultado da rápida conversão e biodisponibilização no SNC, com a meia vida plasmática extremamente curta com a duração de cerca de duas horas (LUNDBLAD et al., 2005). A utilização crônica deste composto por via oral pode gerar a perda progressiva de terminais nervosos nigroestriatais, assim como a redução da capacidade de armazenar e liberar o neurotransmissor dopamina endógeno (CENCI; CROSSMAN, 2018). As principais consequências para os pacientes são a menor duração do efeito da L-DOPA, alterações no estado

motor, movimentos estereotipados com componentes hipercinéticos e distônicos (FABBRINI et al., 2007).

Entretanto, a ação do composto L-DOPA em nosso estudo, foi por somente 30 minutos, e logo após este tempo, um declínio foi verificado de tal forma que este grupo igualou-se ao grupo controle negativo 6-OHDA. Esses resultados diferem dos estudos demonstrados por Lopes (2015) em que a administração da L-DOPA por via oral durante 15 dias foi capaz de reverter e melhorar significativamente a coordenação motora e equilíbrio no rotarod dos animais lesionados por 6-OHDA. Contudo, Lundblad (2004) avaliou o desenvolvimento de movimentos involuntários anormais com o tratamento crônico de L-DOPA, em um modelo de administração de 6-OHDA nas regiões do FPM e do ES. O estudo demonstrou que as doses 6mg/kg e de 8mg/kg de L-DOPA produziram movimentos involuntários da pata dianteira contralateral a lesão em diferentes testes de desempenho motor (LUNDBLAD et al., 2005).

Portanto, os efeitos neurotóxicos na geração de possíveis movimentos involuntários dos peptídeos sintéticos capazes de interferir nos ensaios comportamentais foram avaliados no teste de toxicidade. Os animais que receberam 3 diferentes doses dos peptídeos, sendo as doses de 3,6 nmol e de 1,8 nmol do peptídeo Fraternina-24 produziram uma menor alteração motora, onde os animais permaneceram por mais tempo no rotarod que o grupo avaliado com a maior dose de 7,2 nmol. Interessantemente, a maior dose causou uma latência de queda similar ao grupo 6-OHDA sendo que mesmo procedimento foi evidenciado de igual forma com os outros dois peptídeos modificados, em que as maiores doses do peptídeo Fraternina-14 (6,4 nmol) e do peptídeo Fraternina-10 (8,4 nmol) promoveram alterações motoras e de equilíbrio que prejudicaram a permanência dos animais no

equipamento. Em contrapartida, as doses intermediárias de 3,6 para o peptídeo Fraternina-24 e de 3,2 para o peptídeo Fraternina-10 obtiveram uma proximidade maior com o grupo controle Veículo. Diante disso, observou-se que os animais tratados nas maiores doses de todos os compostos sintéticos obtiveram prejuízos na atividade motora e, portanto, infere-se que essas alterações sejam resultados do efeito neurotóxico dos peptídeos. Os testes mais exigentes, como o demonstrado para a avaliação de desempenho motor no rotarod são importantes, pois revelam os efeitos adversos que auxiliam na seletividade de compostos que possuem ação no SNC.

Interessantemente, o peptídeo selvagem Fraternina não apresentou efeitos que pudessem causar descoordenação motora em camundongos tratados na dose de 3600 μ M (Biolchi, 2014). Sabe-se que os peptídeos avaliados no presente estudo sofreram modificações em sua estrutura química que podem influenciar na sua atividade, e com isso, potencializar o efeito tóxico.

Neste seguimento, um dos efeitos prejudiciais mais comuns de compostos com ação no SNC são os comportamentos discinésicos. Os modelos animais de hemiparkinsonismo podem reproduzir as discinesias de pico da dose da L-DOPA de forma com que os animais possam apresentar comportamentos hipercinéticos e distônicos (CENCI; CROSSMAN, 2018). De acordo com Cenci & Crossman (2018), a expressão de movimentos involuntários verificados nos testes animais está estreitamente relacionado com o pico de liberação de DA no corpo do estriado imediatamente após a administração de L-DOPA. Além disso, outros fármacos antiparkinsonianos podem causar atividades discinésicas como a amantadina, memantina e o propranolol, devido aos prejuízos avaliados em determinados testes comportamentais motores (LUNDBLAD et al., 2005; TRONCI et al., 2014).

O comportamento rotatório apresentado pelos animais lesionados unilateralmente fornece uma sinalização fidedigna quanto à depleção neuronal ocorrida e que acomete principalmente a via do controle motor (SCHWARTING; HUSTON, 1996). A indução deste comportamento deve-se à perda de neurônios da via dopaminérgica, que no caso deste modelo acomete somente um lado do hemisfério cerebral. E, devido ao desbalanço dopaminérgico do lado lesionado, os animais apresentam rotações contralaterais à lesão (para revisão ver Conceição et al., 2010).

Nesse estudo, o número de rotações contralaterais registradas demonstraram diferentes graus de gravidade da DP nos animais, principalmente para os grupos 6-OHDA e L-DOPA. Os animais tratados com a L-DOPA apresentaram um número maior de giros se comparados ao grupo 6-OHDA. Um achado interessante, diz respeito ao menor número de rotações anti-horárias (contralateral à lesão) causada pelo peptídeo Fraternina-24 na maior dose, indicando que a deservação não foi completa (Figura 21- A). Estudos apontam que quando o nível de lesão é amplo, os animais podem apresentar rotações espontâneas (ipsilateral à lesão) que só pode ser observada quando a deservação é de aproximadamente 90% (BLANDINI; ARMENTERO, 2012).

Os animais tratados com o peptídeo Fraternina-14 em todas as doses e Fraternina-10 na menor dose apresentaram um menor número de rotações contralaterais. Esses dados corroboram com os experimentos realizados de avaliação da coordenação motora, em que as menores doses demonstraram uma maior taxa de permanência no rotarod (Figura 21-B,C). Por conseguinte, as alterações comportamentais visualizadas a partir do teste de desafio com apomorfina comprova que houve uma diminuição no número de giros dos animais

tratados com os peptídeos sintéticos, o que pode indicar que a preservação desses neurônios foi realizada.

Foi demonstrado por Braga (2008) que a administração intranigral de L-DOPA foi capaz de promover uma neurotoxicidade aguda nos neurônios dopaminérgicos, semelhante à observada pelo composto neurotóxico MPTP em que a infusão intranigral de L-DOPA na dose de 10 μ M levou a uma redução de 30,5% dos neurônios dopaminérgicos e conseqüentemente nos níveis de dopamina. Tal fato pode ser explicado pela alta geração de produtos metabólitos, considerados tóxicos para os neurônios dopaminérgicos pela conversão da L-DOPA em dopamina, como as quinonas, semiquinonas, peróxido de hidrogênio e outros radicais livres (FAHN; COHEN, 1992).

Desta maneira, a neuroproteção pela manutenção de neurônios dopaminérgicos na região da SN foi realizada por meio da quantificação de células viáveis reativas a enzima tirosina hidroxilase (TH). Esta avaliação imunohistoquímica auxilia na complementação os dados obtidos pelos modelos animais e estimula a busca pela atividade gerada pelos compostos peptídicos estudados. Interessantemente, a quantificação de neurônios saudáveis no lado lesionado foi verificada somente para as doses de 3,6 nmol e 7,2 nmol do peptídeo Fraternina-24. A viabilização de neurônios reativos a TH gera resultados perceptíveis que podem ser utilizados para avaliar a capacidade neuroprotetora do composto em estudo. Como no caso de um estudo desenvolvido por Kime colegas (2016) em que os camundongos tratados com o Veneno Bruto (BV) de *Apis mellifera* obtiveram um aumento de 78% de neurônios reativos a TH na SNpc em comparação com o animal saudável.

Vale destacar, que o modelo de neuroproteção escolhido para esse estudo consistiu na infusão intraestriatal do composto 6-OHDA. O composto neurotóxico 6-OHDA desempenha um papel significativo na ativação de eventos inflamatórios relacionados com a ativação de células microgliais. Dentre os principais eventos, identifica-se a liberação de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas pró-inflamatórias ou citocinas que estimulam a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (AMOR et al., 2013; PEROVIC; RAIC, 2004).

Neste contexto, estudos em camundongos geneticamente modificados e de vias moleculares ativadas pelas células gliais podem ser o início para a descoberta dos mecanismos que causam a neurodegeneração no tecido cerebral (MCGEER; MCGEER, 2004). Um dos fatores citotóxicos primários mais estudados envolvidos na neuroinflamação é a produção de citocinas pro-inflamatórias liberadas pelas células microgliais ativadas. Essas moléculas regulam positivamente a expressão do receptor de macrófago CD23. A ativação de CD23 induz a expressão da NOSi, que promove a síntese de altos níveis de óxido nítrico, resultando na morte celular (HANISCH; KETTENMANN, 2007).

Na DP, a perda neuronal torna-se um conjunto de fatores que podem ter como consequências a ativação crônica neuroinflamatória, as alterações dos níveis de espécies reativas de oxigênio, o aumento da prostaglandina E2 primárias, citocinas inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (HOROWITZ; GREENAMYRE, 2010; MACCHI et al., 2015; PERFEITO; REGO, 2012). Outro fator importantíssimo que acontece em pacientes com a DP é o acúmulo da proteína Alfa-sinucleína na forma de agregados filamentosos, que pode ativar diretamente a micróglia, através da expressão de um subconjunto de receptores com padrões de reconhecimento específicos, levando a um processo

neuroinflamatório e degeneração neural (BÉRAUD et al., 2013; REYNOLDS et al., 2009; ZHANG et al., 2011; SU et al., 2008). Estudos *post-mortem* e estudos clínicos em pacientes com a DP demonstram os níveis elevados de citocinas neuroinflamatórias no cérebro, líquido cefalorraquidiano juntamente com a gliose exarcebada na região da SN (Parnetti, 2016, Reale, 2009). Com maior frequência no cérebro de pacientes com a DP do que em outras doenças neurodegenerativas está a presença dos linfócitos infiltrados, consistindo em ambas as células T CD8 e CD4+ e ativação da resposta imune (BROCHARD et al., 2009). Com base nisso, correlacionar o uso de fármacos antiinflamatórios com a diminuição no risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a DP, torna-se ferramenta importante na busca de novos compostos antineuroinflamatórios (HIRSCH; HUNOT, 2009).

Em adição, estudos experimentais em camundongos lesionados por MPTP indicam que linfócitos T CD4+ são vias de processos neurodegenerativos que utiliza mecanismos via receptores Fas. Até o momento, o antígeno envolvido na resposta imune adaptativa e na infiltração de linfócitos não tem sido formalmente identificado, mas epítomos da proteína alfa-sinucleína oxidativamente modificada são altas na lista de suspeitos. A hipótese é apoiada por duas linhas de evidências: a primeira é a superexpressão da alfa-sinucleína em animais levando a processos neuroinflamatórios (SU et al., 2008) e a segunda é a alfa-sinucleína oxidativamente modificada e em particular o nitrato de alfa-sinucleína (N-a-syn) que é encontrada em abundância no cérebro de pacientes com DP, como também em modelos animais de lesionados por MPTP. Por este motivo, estudos que visam a identificação de marcadores anti e pró-inflamatórios ainda são necessários na tentativa de elucidar a via para o controle da degeneração induzida pelo peptídeo em estudo.

Fundamentado nisso, o presente estudo buscou investigar os níveis das interleucinas IL-1 e IL-6 e do fator de necrose tumoral (TNF- α) em tecido cerebral após 7 dias da infusão de 6-OHDA. Os resultados demonstraram uma maior quantificação da interleucina IL-6 e do TNF- α para os animais controle negativo (6-OHDA). Entretanto, para os peptídeos estudados, apenas a maior dose de 7,2 nmol do peptídeo Fraternina-24 apresentou um efeito relevante na diminuição da liberação de TNF- α .

Os modelos animais que utilizam compostos neurotóxicos podem induzir a morte celular pela ativação de mecanismos neuroinflamatórios em horas. A ativação microglial e rápida degeneração da região da SN a partir de 72 horas após a lesão axonal e astrocitose foi demonstrada por Walsh e colegas (2011) em um modelo de injeção intraestriatal por 6-OHDA durante 2 semanas. A explicação para este acontecimento, é que no decurso da neuroinflamação, as células microgliais liberam citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , quimiocinas e o TNF- α . Estes mediadores podem causar o aumento da permeabilidade da Barreira Hematoencefálica (BHE) estimulando a migração de células dendríticas (Souza, 2016).

Em particular, o TNF- α pode iniciar a destruição do tecido cerebral, e manter uma resposta inflamatória duradoura após ser produzida pela micróglia, durante o processo inflamatório (More 2013). De acordo com PEROVIC e RAIC (2004), o envolvimento da citocina pró-inflamatória TNF- α e o seu receptor TNF- α -RI em modelos hemiparkinsonianos foram significativamente altos. Após 24h da infusão por 6-OHDA na região do estriado os animais apresentavam uma neurodegeneração de 46% quando comparando com o controle (PEROVIC; RAIC, 2004). Mogi et al. (2000) comparou os níveis de TNF- α nas regiões do ES, SN e córtex frontal entre o lado veículo e o lado lesado após 5 dias da injúria por 6-OHDA. Neste estudo, a

quantificação TNF- α pelo método Elisa nas regiões do lado lesado (6-OHDA) foram significativamente maiores que o lado veículo. Interessantemente, em nosso estudo não houve diferenças significativas na quantificação dos níveis de citocinas inflamatórias entre os dois hemisférios (dados não publicados). Portanto, a inibição da citocina TNF- α realizada pelo peptídeo Fraternina-24 pode ser tornar uma importante ferramenta antineuroinflamatória para os casos iniciais de depleção neuronal na DP.

Outras substâncias como o veneno da abelha *Apis mellifera* tem demonstrado uma ampla atividade farmacológica no tratamento de doenças reumáticas autoimunes e osteoartrites em modelos animais (GABAY et al., 2014; NISBET et al., 2012) como também, apresentando atividades neuroprotetoras e modulatórias. Os compostos Melitina e o BV foram capazes diminuir a indução de NO e de NOSi e a expressão de FN- κ B (fator nuclear kappa B) em culturas de células microgliais (BV2) (FRANCARDO et al., 2011b; MOON et al., 2007). Da mesma forma, a redução da ativação de astrócitos foi verificada em um estudo desenvolvido por KIM et al. (2016), em que o efeito neuroprotetor de BV e do cloridrato de pramipexol, utilizado para o tratamento da DP, preveniram as deficiências motoras e reduziram a perda de células dopaminérgicas, em um modelo murino subcrônico induzido por MPTP. Além disso, o tratamento com acupuntura apresentou efeitos neuroprotetores em modelos animais (CHO et al., 2017; DOO et al., 2010), como também a supressão dos níveis de TNF- α e de IL-1 β (KHALIL et al., 2014).

Alem disso, fármacos antagonistas dos receptores glutamatérgicos não competitivos de NMDA, como a amantadina e a memantina, são amplamente utilizados como agentes antiparkinsonianos (OLIVARES et al., 2012). Porém, ambos os compostos podem causar muitos efeitos colaterais indesejados como, por

exemplo, a psicose farmacotóxica e, por este motivo faz-se necessário à busca por novos fármacos neuroprotetores que sejam capazes de atuar como antagonistas de glutamatérgicos na tentativa de retardar a progressão e proporcionar uma melhora na sintomatologia da DP. Assim, o controle da ação fisiológica mediada por glutamato pode fornecer novas estratégias de tratamento, não apenas sintomáticas, mas neuroprotetoras contra a morte neural, auxiliando em longo prazo na terapia de pacientes portadores da DP (BLANDINI; GREENAMYRE, 1998).

Entretanto, em nosso estudo, os peptídeos sintéticos Fraternina-24 e Fraternina-14 não apresentaram competição quando comparado com o glutamato marcado, e, portanto pode-se inferir que este composto não esteja agindo de forma competitiva ao glutamato liberado fisiologicamente, podendo estar atuando e impedindo a ativação de outras vias de morte neural.

Com bases nesses estudos, uma possível ação dos peptídeos sintéticos, em particular da Fraternina-24 pode estar relacionada com a diminuição da expressão de mediadores inflamatórios, já evidenciados em vários estudos para a peçonha de abelhas (DOO et al., 2010; IM et al., 2016; MOON et al., 2007).

Desta forma, substâncias que alteram o curso da morte neuronal constituem essencial e promissor alvo de investigação farmacológica advindo de moléculas naturais que podem ser utilizadas não somente como atenuantes dos sinais clínicos motores e não motores da DP, mas como um futuro fármaco que favoreça a sobrevivência das células acometidas por esta doença.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- As estruturas tridimensionais preditas para os peptídeos sintéticos adotam conformações predominante em tipo alfa-hélice.
- O peptídeo Fraternina-24 compartilha de algumas propriedades com os peptídeos GPL-1 e exedina-4, como as regiões N-terminais flexíveis seguidos por uma α -hélice.
- O peptídeo Fraternina-14 apresentou propriedades semelhantes à toxina MMP23 que atua como bloqueador de canais de potássio, com um papel importante na diminuição da ativação neuronal.
- O peptídeo sintético Fraternina-24 manteve o efeito antiparkinsoniano e a integridade dos neurônios dopaminérgicos, com ação possivelmente anti-inflamatória.
- O peptídeo Fraternina-14 quando administrado na dose de 3,2 demonstrou uma ação positiva na performance motora dos animais sem ação significativa na neuroquímica e no perfil anti-inflamatório.
- Ambos os peptídeos Fraternina-24 e Fraternina-14 diminuíram o número de rotações contralaterais apresentados pelos animais demonstrando um efeito antiparkinsoniano relevante.
- Com relação à avaliação dos efeitos neurotóxicos locomotores os animais tratados com as menores doses de todos os peptídeos, obtiveram uma melhora da coordenação motora, e em contrapartida as maiores doses promoveram alterações de equilíbrio que prejudicaram a permanência dos animais no equipamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.; AH, L. **Cellular and Molecular Immunology**. 6th. ed. [s.l.] Saunders Elsevier, 2003.
- AHLISKOG, J.; MUENTER, M. Frequency of levodopa related dyskinesia and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. **Mov Disord**, v. 16, n. 3, p. 448–58., 2001.
- ALBANESE, A. Diagnostic criteria for Parkinson ' s disease. **Neurol Sci**, v. 24, p. 23–26, 2003.
- ALSHAMMARI, T. M.; ALMUTAIRI, E. N. Use of an entacapone-containing drug combination and risk of death: Analysis of the FDA AERS (FAERS) database. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 1, p. 28–32, 2015.
- ALVAREZ-FISCHER, D. et al. Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and α -synuclein-deleted mice. **Experimental Neurology**, v. 210, n. 1, p. 182–193, 2008.
- AMOR, S. et al. Inflammation in neurodegenerative diseases - an update. **Immunology**, v. 142, n. 2, p. 151–166, 2013.
- ANDRADE, L. A. F.; FERRAZ, H. B. **Inibição Enzimática, Neuroproteção e Tratamento da Doença de Parkinson..pdfRev.Neurosciência**, 1997.
- AQUILONIUS, S. M.; NYHOLM, D. Development of new levodopa treatment strategies in Parkinson's disease—from bedside to bench to bedside. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 122, n. 2, p. 71–77, 2017.
- ARIAS, H. R.; BLANTON, M. P. a -Conotoxins. v. 32, p. 1017–1028, 2000.
- ARROYO, D. S. et al. Toll-like receptors are key players in neurodegeneration. **Int Immunopharmacol.**, v. 11, n. 10, p. 1415–1421, 2011.
- ARUNDINE, M.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. **Cell Calcium**, v. 34, n. 4–5, p. 325–337, 2003.
- ATHAUDA, D. et al. Exenatide once weekly versus placebo in Parkinson's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 390, n. 10103, p. 1664–1675, 2017.
- AVILES-OLMOS, I. et al. Exenatide and the treatment of patients with Parkinson ' s disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 6, p. 2730–2736, 2013b.
- AVILES-OLMOS, I. et al. Motor and Cognitive Advantages Persist 12 Months after Exenatide Exposure in Parkinson's Disease. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 4, n. 3, p. 337–344, 2015.
- AWAD, K. et al. Bee venom for the treatment of Parkinson's disease: How far is it

- possible? **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 91, p. 295–302, 2017.
- AYTON, S. et al. The effect of dopamine on MPTP-induced rotarod disability. **Neuroscience Letters**, v. 543, p. 105–109, 2013.
- BARBOSA, M. T. et al. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: A community-based survey in Brazil (the Bambuí Study). **Movement Disorders**, v. 21, n. 6, p. 800–808, 2006.
- BEART, P. M.; O'SHEA, R. D. Transporters for L-glutamate: An update on their molecular pharmacology and pathological involvement. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 1, p. 5–17, 2007.
- BELEBONI, R. O. et al. Neurochemical Characterization of a Neuroprotective Compound from. **Molecular Pharmacology**, v. 69, n. 6, p. 1998–2006, 2006.
- BENKLER, M.; AGMON-LEVIN, N.; SHOENFELD, Y. Parkinson's disease, autoimmunity, and olfaction. **International Journal of Neuroscience**, v. 119, n. 12, p. 2133–2143, 2009.
- BÉRAUD, D. et al. Microglial activation and antioxidant responses induced by the Parkinson's disease protein α -synuclein. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 8, n. 1, p. 94–117, 2013.
- BERMEJO, M. K. et al. Preparation of synaptic plasma membrane and postsynaptic density proteins using a discontinuous sucrose gradient. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 91, p. e51896, 2014.
- BERTILSSON, G. et al. Peptide hormone exendin-4 stimulates subventricular zone neurogenesis in the adult rodent brain and induces recovery in an animal model of Parkinson's disease. **J Neurosci Res.**, v. 86, n. 2, p. 326–338, 2008.
- BETZ, A. J. et al. The muscarinic receptor antagonist tropicamide suppresses tremulous jaw movements in a rodent model of parkinsonian tremor: Possible role of M4 receptors. **Psychopharmacology**, v. 194, n. 3, p. 347–359, 2007.
- BIOLCHI, A. M. **Avaliação antiparkinsoniana e neuroprotetora do peptídeo Fraternalina isolado da peçonha da vespa *Parachartergus fraternus* no modelo murino da Doença de Parkinson.** [s.l.] Universidade de Brasília, 2014.
- BLANDINI, F.; ARMENTERO, M.-T. Animal models of Parkinson's disease. **FEBS Journal**, v. 279, n. 7, p. 1156–1166, 2012.
- BLANDINI, F.; GREENAMYRE, J. T. Prospects of glutamate antagonists in the therapy of Parkinson's disease. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 12, n. 1, p. 4–12, 1998.
- BLESA, J. et al. Compensatory mechanisms in Parkinson's disease: Circuits adaptations and role in disease modification. **Experimental Neurology**, v. 298, n. October, p. 148–161, 2017.

BLOCK, M. L.; ZECCA, L.; HONG, J.-S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 57–69, 2007.

BONUCCELLI, U.; COLZI, A.; DOTTO, P. DEL. Pergolide in the Treatment of Patients With Early and Advanced Parkinson ' s Disease. **Clinical Neuropharmacology**, v. 25, n. 1, p. 1–10, 2002.

BOTOS, I.; SEGAL, D.; DAVIES, D. The structural biology of Toll-like receptors. **Structure**, v. 19, n. 4, p. 447–459, 2011.

BOVÉ, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 211, p. 51–76, 2012.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K. Pathophysiologie des sporadischen Morbus Parkinson. **Fortschritte der Neurologie Psychiatrie**, v. 78, n. SUPPL. 1, p. 2–4, 2010.

BRAGA, A. R. **INDUÇÃO DA MORTE DE NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS POR MPTP COMO MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON: UMA ABORDAGEM MOLECULAR E FARMACOLÓGICA**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2008.

BRETÓN, R. R.; CÉSAR, J.; RODRÍGUEZ, G. Excitotoxicity and Oxidative Stress in Acute Ischemic Stroke. **Acute Ischemic Stroke**, p. 30–58, 2012.

BROCHARD, V. et al. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease_2009. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 1, 2009.

BROOKS, S. P.; DUNNETT, S. B. Tests to assess motor phenotype in mice: A user's guide. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 7, p. 519–529, 2009.

BULAJ, G. Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 1, p. 87–92, 2005.

BUNCH, L.; ERICHSEN, M. N.; JENSEN, A. A. Excitatory amino acid transporters as potential drug targets. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 13, n. 6, p. 719–31, 2009.

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 75, n. 3, p. 197–202, 2006.

CAMPBELL, J. E.; DRUCKER, D. J. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 6, p. 819–837, 2013.

CENCI, M. A.; CROSSMAN, A. R. Animal Models of L -Dopa-Induced Dyskinesia in Parkinson ' s Disease The MPTP Model in Nonhuman Primates Paved the Way for LID. v. 0, n. 0, p. 1–11, 2018.

CEREDA, E. et al. Erratum to: Efficacy of rasagiline and selegiline in Parkinson's disease: a head-to-head 3-year retrospective case–control study (J Neurol, (2017), 264, (1254-1263), 10.1007/s00415-017-8523-y). **Journal of Neurology**, v. 264, n. 9, p. 2051, 2017.

CHANG, T. J. et al. Glucagon-like peptide-1 prevents methylglyoxal-induced apoptosis of beta cells through improving mitochondrial function and suppressing prolonged AMPK activation. **Scientific Reports**, v. 6, n. March, p. 1–11, 2016.

CHEN, S. et al. Amelioration of neurodegenerative changes in cellular and rat models of diabetes-related Alzheimer's disease by exendin-4. **Age**, v. 34, n. 5, p. 1211–1224, 2012.

CHIARINI, A. et al. The killing of neurons by beta-amyloid peptides, prions, and pro-inflammatory cytokines. **Italian journal of anatomy and embryology**, v. 111, n. 4, p. 221–246, 2005.

CHO, S.-Y. et al. Efficacy of Combined Treatment with Acupuncture and Bee Venom Acupuncture As an Adjunctive Treatment for Parkinson's Disease. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 0, n. 0, p. acm.2016.0250, 2017.

CHO, S. Y. et al. Effectiveness of acupuncture and bee venom acupuncture in idiopathic Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 18, n. 8, p. 948–952, 2012.

CHUNG, E. S. et al. Neuro-protective effects of bee venom by suppression of neuroinflammatory responses in a mouse model of Parkinson's disease: Role of regulatory T cells. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, n. 8, p. 1322–1330, 2012.

CRAIGO, J. K.; MONTELARO, R. C. Lessons in AIDS vaccine development learned from studies of equine infectious, anemia virus infection and immunity. **Viruses**, v. 5, n. 12, p. 2963–2976, 2013.

CRISPO, J. A. G. et al. Associations between anticholinergic burden and adverse health outcomes in Parkinson disease. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–15, 2016.

DA CONCEIÇÃO, F. S. L. et al. Murine Model for Parkinson's Disease: from 6-OH Dopamine Lesion to Behavioral Test. **Journal of Visualized Experiments**, n. 35, p. 9–11, 2010.

DE VIRGILIO, A. et al. Parkinson's disease: Autoimmunity and neuroinflammation. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 10, p. 1005–1011, 2016.

DELVES, P.; ROITT, I. M. The Immune System – First of two parts. **Advances in immunology**, v. 343, n. 1, p. 37–49, 2000.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: An evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Experimental Neurology**, v. 175, n. 2, p. 303–317, 2002.

DEVOS, D. et al. New pharmacological options for treating advanced parkinson's disease. **Clinical Therapeutics**, v. 35, n. 10, p. 1640–1652, 2013.

DONG, J. et al. Current Pharmaceutical Treatments and Alternative Therapies of Parkinson's Disease. **Current Neuropharmacology**, v. 14, n. 4, p. 339–355, 2016.

DONNELLY, D. The structure and function of the glucagon-like peptide-1 receptor and its ligands. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, n. 1, p. 27–41, 2012.

DOO, A.-R. et al. Neuroprotective effects of bee venom pharmaceutical acupuncture in acute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease. **Neurological research**, v. 32 Suppl 1, p. 88–91, 2010.

DORSEY, E. R. et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**, v. 68, n. 5, p. 384–386, 2007.

DOS SANTOS, L. D. et al. Profiling the proteome of the venom from the social wasp polybia paulista: A clue to understand the envenoming mechanism. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 8, p. 3867–3877, 2010.

EDWARDS, A. B. et al. Characterisation of neuroprotective efficacy of modified poly-arginine-9 (R9) peptides using a neuronal glutamic acid excitotoxicity model. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 9, 2016.

ELBAZ, A. et al. Epidemiology of Parkinson ' s disease. **Revue Neurologique**, v. 172, n. 1, p. 14–26, 2016.

ELLIS, J. M.; FELL, M. J. Current approaches to the treatment of Parkinson's Disease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 18, p. 4247–4255, 2017.

ENG, J. et al. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue from Heloderma suspectum venom. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 11, p. 7402–7405, 1992.

FABBRINI, G. et al. Levodopa-Induced Dyskinesias. v. 22, n. 10, p. 1379–1389, 2007.

FAHN, S.; COHEN, G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: Evidence supporting it. **Annals of Neurology**, v. 32, n. 6, p. 804–812, 1992.

FAN, R. et al. Exendin-4 protects pancreatic beta cells from human islet amyloid polypeptide-induced cell damage: Potential involvement of AKT and mitochondria biogenesis. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 12, n. 9, p. 815–824, 2010.

FEARNLEY, J. M.; LESS, A. J. AGEING AND PARKINSON ' S DISEASE : SUBSTANTIA. **Brain**, v. 114, p. 2283–2301, 1991.

FRANCARDO, V. et al. Impact of the lesion procedure on the profiles of motor

impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 42, n. 3, p. 327–340, 2011.

GABAY, C. et al. Biological agents in monotherapy for the treatment of rheumatoid arthritis. n. April, p. 1–11, 2014.

GALEA, C. A. et al. Domain structure and function of matrix metalloprotease 23 (MMP23): role in potassium channel trafficking. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 71, n. 7, p. 1191–1210, 2014.

GALHARDO, M. M. A. M. C.; AMARAL, A. K. F. J. A.; VIEIRA, A. C. C. CARACTERIZAÇÃO DOS DISTÚRBIOS COGNITIVOS. **Revista CEFAC**, v. 11, n. Supl2, p. 251–257, 2009.

GALLWITZ, B. Glucagon-like Peptide – 1 Analogues for Type 2 Diabetes Mellitus. **Drugs**, v. 71, n. 13, p. 1675–1688, 2011.

GERTLER, T. S.; CHAN, C. S.; SURMEIER, D. J. Dichotomous Anatomical Properties of Adult Striatal Medium Spiny Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 43, p. 10814–10824, 2008.

GOBBI, L. T. B. et al. Núcleos da base e controle locomotor: aspectos neurofisiológicos e evidências experimentais. **Rev. bras. Educ. Fís. Esp.**, v. 20, n. 1, p. 97–101, 2006.

GÖKE, R. et al. Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9–39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7–36)-amide receptor of insulin-secreting h-cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 26, p. 19650–19655, 1993.

GOLDSBY, R. A. et al. **Immunology**. 5th editio ed. New York: W H Freeman & Co., 2003.

GOMES, P. C. et al. Structure-function relationships of the peptide Paulistine: A novel toxin from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1840, n. 1, p. 170–183, 2014.

GONZÁLEZ-SCARANO, F.; BALTUCH, G. Microglia As Mediators of Inflammatory and Degenerative Diseases. **Annual Review of Neuroscience**, v. 22, n. 1, p. 219–240, 1999.

GONZALEZ, J. et al. NMDARs in neurological diseases: A potential therapeutic target. **International Journal of Neuroscience**, v. 125, n. 5, p. 315–327, 2015.

GOODMAN, L.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9ed. ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill, 2005.

GÖTZ, T. et al. Functional properties of AMPA and NMDA receptors expressed in identified types of basal ganglia neurons. **The Journal of neuroscience: the**

official journal of the Society for Neuroscience, v. 17, n. 1, p. 204–15, 1997.

GOULART, F.; PEREIRA, L. X. Uso de escalas para avaliação da doença de Parkinson em fisioterapia Main scales for Parkinson ' s disease assessment : use in physical therapy Metodologia. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 11, n. 1, p. 49–56, 2005.

GREENAMYRE, J. T. Glutamatergic influences on the basal ganglia. **Clinical neuropharmacology**, v. 24, n. 2, p. 65–70, 2001.

GULLO, F. et al. Plant polyphenols and exendin-4 prevent hyperactivity and TNF- α release in LPS-treated in vitro neuron/astrocyte/microglial networks. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. SEP, p. 1–13, 2017.

GUZMAN, J. N. et al. Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 696–700, 2010.

HAMMOND, C.; BERGMAN, H.; BROWN, P. Pathological synchronization in Parkinson's disease: networks, models and treatments. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 7, p. 357–364, 2007.

HANISCH, U.-K. K.; KETTENMANN, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 1387–1394, 2007.

HARKAVYI, A. et al. Glucagon-like peptide 1 receptor stimulation reverses key deficits in distinct rodent models of Parkinson's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, p. 1–9, 2008.

HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422–427, 1972.

HAUSER, R. A. et al. Droxidopa and reduced falls in a trial of Parkinson disease patients with neurogenic orthostatic hypotension. **Clinical Neuropharmacology**, v. 39, n. 5, p. 220–226, 2016.

HAUSER, R. A.; ELLENBOGEN, A.; KHANNA, S. Onset and duration of effect of extended-release carbidopa-levodopa in advanced Parkinson ' s disease. p. 839–845, 2018.

HIRSCH, E. C. et al. Animal models of Parkinson's disease in rodents induced by toxins: an update. **Journal of neural transmission. Supplementum**, n. 65, p. 89–100, 2003.

HIRSCH, E. C.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 4, p. 382–397, 2009.

HIRSCH, E. C.; VYAS, S.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 18, p. S210–S212, 2012.

HO, C. L.; HWANG, L. L. Local edema induced by the black-bellied hornet (*Vespa*

basalis) venom and its components. **Toxicon**, v. 29, n. 8, p. 1033–1042, 1991.

HOROWITZ, M. P.; GREENAMYRE, J. T. Gene-environment interactions in parkinson's disease: The importance of animal modeling. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 88, n. 4, p. 467–474, 2010.

HUBBLE, J. Long-term studies of dopamine agonists. **Neurology**, v. 58, n. 4, p. 42–50, 2002.

IANCU, R. et al. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 162, n. 1, p. 1–10, 2005.

IM, E. J. et al. Anti-Inflammatory Activity of Bee Venom in BV2 Microglial Cells: Mediation of MyD88-Dependent NF- κ B Signaling Pathway. v. 2016, 2016.

IMPERIAL, J. S. et al. A novel conotoxin inhibitor of Kv1.6 channel and nAChR subtypes defines a new superfamily of conotoxins. **Biochemistry**, v. 45, n. 27, p. 8331–8340, 2006.

INDEN, M. et al. A4 Nicotinic Acetylcholine Receptor Modulated By Galantamine on Nigrostriatal Terminals Regulates Dopamine Receptor-Mediated Rotational Behavior. **Neurochemistry International**, v. 94, p. 74–81, 2016.

INZELBERG, R.; SCHECHTMAN, E.; NISIPEANU, P. Cabergoline, pramipexole and ropinirole used as monotherapy in early Parkinson's disease: An evidence-based comparison. **Drugs and Aging**, v. 20, n. 11, p. 847–855, 2003.

IRIBARREN, P. et al. Role of formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1/FPR2) in mononuclear phagocyte responses in Alzheimer disease. **Immunologic research**, v. 31, n. 3, p. 165–176, 2005.

IWAI, T. et al. Glucagon-like peptide-1 protects synaptic and learning functions from neuroinflammation in rodents. **Journal of Neuroscience Research**, v. 92, n. 4, p. 446–454, 2014.

JANE, D. E.; LODGE, D.; COLLINGRIDGE, G. L. Kainate receptors: Pharmacology, function and therapeutic potential. **Neuropharmacology**, v. 56, n. 1, p. 90–113, 2009.

JANKOVIC, J. Parkinson ' s disease : clinical features and diagnosis. n. 1957, p. 368–376, 2008.

JENNER, P. Pharmacology of dopamine agonists in the treatment of Parkinson's disease. **Neurology**, v. 1, p. 1–8, 2002.

K, D.; S, S.; CE, C. Catechol-O-methyltransferase inhibitors for levodopa- induced complications in Parkinson ' s disease (Review). **Health (San Francisco)**, n. 3, 2009.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity:

update on Toll-like receptors. **Nature immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–84, 2010.

KEW, J. N. C. Positive and negative allosteric modulation of metabotropic glutamate receptors: emerging therapeutic potential. **Pharmacology & therapeutics**, v. 104, n. 3, p. 233–44, 2004.

KHALIL, W. K. B. et al. Article in press. 2014.

KIM, D. S. et al. A New Treatment Strategy for Parkinson's Disease through the Gut-Brain Axis. **Cell Transplantation**, v. 26, n. 9, p. 1560–1571, 2017.

KIM, M. E. et al. Neuroprotective effect of bee venom is mediated by reduced astrocyte activation in a subchronic MPTP-induced model of Parkinson's disease. **Archives of Pharmacal Research**, v. 39, n. 8, p. 1160–1170, 2016.

KIM, S. U.; VELLIS, J. Microglia in health and disease. **Microglia in Health and Disease**, v. 81, p. 302–313, 2005.

KIM, Y. S.; JOH, T. H. Matrix metalloproteinases, new insights into the understanding of neurodegenerative disorders. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 20, n. 2, p. 133–143, 2012.

KIRISCHUK, S.; KETTENMANN, H.; VERKHRATSKY, A. Membrane currents and cytoplasmic sodium transients generated by glutamate transport in Bergmann glial cells. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 454, n. 2, p. 245–252, 2007.

KREUTZBERG, G. W. Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. **Trends in Neurosciences**, v. 19, n. 8, p. 312–318, 1996.

KUOPPAMÄKI, M.; LEINONEN, M.; POEWE, W. Efficacy and safety of entacapone in levodopa/carbidopa versus levodopa/benserazide treated Parkinson's disease patients with wearing-off. **Journal of Neural Transmission**, v. 122, n. 12, p. 1709–1714, 2015.

LALONDE, R.; STRAZIELLE, C. Brain regions and genes affecting postural control. **Progress in Neurobiology**, v. 81, n. 1, p. 45–60, 2007.

LEE, S.-H. et al. Sex differences in acupuncture effectiveness in animal models of Parkinson's disease: a systematic review. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 430, 2016.

LEHNARDT, S. et al. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 100, n. 14, p. 8514–8519, 2003.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 10, p. 790–802, 2003.

LI, H. T. et al. Exendin-4 Enhances Motor Function Recovery via Promotion of

Autophagy and Inhibition of Neuronal Apoptosis After Spinal Cord Injury in Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 6, p. 4073–4082, 2016.

LI, L.; ZHOU, F. M. Parallel dopamine D1 receptor activity dependence of L-Dopa-induced normal movement and dyskinesia in mice. **Neuroscience**, v. 236, p. 66–76, 2013.

LIPTON, S. A.; ROSENBERG, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **The New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 9, p. 613–622, 1994.

LITIM, N.; MORISSETTE, M.; DI PAOLO, T. Neuroactive gonadal drugs for neuroprotection in male and female models of Parkinson's disease. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2015.

LIU, B.; GAO, H. M.; HONG, J. S. Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: Role of neuroinflammation. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 8, p. 1065–1073, 2003.

LOPES, S. C. ENVOLVIMENTO DO SISTEMA NORADRENÉRGICO E O EFEITO DE β -BLOQUEADORES NAS DISCINESIAS INDUZIDAS POR L-DOPA EM UM MODELO ANIMAL DA Florianópolis. p. 105, 2015.

LUGINGER, E. et al. Beneficial effects of amantadine on L-dopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, v. 15, n. 5, p. 873–878, 2000.

LUNDBLAD, M. et al. Pharmacological validation of a mouse model of L-DOPA-induced dyskinesia. **Experimental Neurology**, v. 194, n. 1, p. 66–75, 2005.

MACCHI, B. et al. Inflammatory and Cell Death Pathways in Brain and Peripheral Blood in Parkinson's disease. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 14, n. 3, p. 313–324, 2015.

MACHADO, A. et al. Revisão. v. 27, n. 5, p. 781–789, 2004.

MAITI, P.; MANNA, J.; DUNBAR, G. L. Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. **Translational Neurodegeneration**, v. 6, n. 1, p. 28, 2017.

MALIK, D. K. et al. Recent advances in protein and peptide drug delivery systems. **Current Drug Delivery**, v. 4, n. 2, p. 141–151, 2007.

MANDEL, S. et al. Neuroprotective Strategies in Parkinson's Disease An Update on Progress. **CNS Drugs**, v. 17, n. 10, p. 729–762, 2003.

MARINO, M. J.; VALENTI, O.; CONN, P. J. Glutamate Receptors and Parkinson's Disease Opportunities for Intervention. **Drugs Aging**, v. 20, n. 5, p. 377–397, 2003.

MARSILI, L.; MARCONI, R.; COLOSIMO, C. **Treatment Strategies in Early Parkinson's Disease**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 132

MARTÍNEZ-LOZADA, Z.; ORTEGA, A. Glutamatergic transmission: A matter of three. **Neural Plasticity**, v. 2015, 2015.

MASILAMONI, G. J. et al. Metabotropic glutamate receptor 5 antagonist protects dopaminergic and noradrenergic neurons from degeneration in MPTP-treated monkeys. **Brain**, v. 134, n. 7, p. 2057–2073, 2011.

MATEUS, S. **Análises dos comportamentos envolvidos na organização social e no processo de enxameio de *Parachartergus fraternus* (Hymenoptera, Polistinae, Epiponini)**. [s.l.] Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da USP., 2005.

MAZZONI, P.; SHABBOTT, B.; CORTÉS, J. C. Motor control abnormalities in Parkinson's disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 6, p. 1–17, 2012.

MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. Inflammation and the degenerative diseases of aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1035, p. 104–116, 2004.

MCNICHOLAS, S. et al. Presenting your structures: The CCP4mg molecular-graphics software. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 67, n. 4, p. 386–394, 2011.

MEHTA, A. et al. Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. **European Journal of Pharmacology**, v. 698, n. 1–3, p. 6–18, 2013.

MELO, S.; CUNHA, S.; FIALHO, S. L. Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos. v. 33, n. 4, p. 469–477, 2012.

MELONI, B. P. et al. Poly-arginine and arginine-rich peptides are neuroprotective in stroke models. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 35, n. 6, p. 993–1004, 2015.

MENDES, M. A. et al. Structural characterization of novel chemotactic and mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes* by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 6, p. 636–642, 2004.

MEREDITH, G. E. G. E.; SONSALLA, P. K. P. K.; CHESSELET, M. F. M. Animal Models of Parkinson's Disease Progression. **Acta neuropathologica**, v. 115, n. 4, p. 385–398, 2008.

MINK, J. W. the Basal Ganglia : Focused Selection and Inhibition of Competing Motor Programs. v. 50, 1996.

MOGI, M. et al. Increase in level of tumor necrosis factor- α in 6-hydroxydopamine-

lesioned striatum in rats is suppressed by immunosuppressant FK506. v. 289, p. 165–168, 2000.

MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R. T.; SOARES, A. M. Pharmacological perspectives of wasp venom. **Protein and peptide letters**, v. 16, n. 8, p. 944–52, 2009.

MOON, D. et al. Bee venom and melittin reduce proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. v. 7, p. 1092–1101, 2007.

MORENO, M.; GIRALT, E. Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: Melittin, apamin and mastoparan. **Toxins**, v. 7, n. 4, p. 1126–1150, 2015.

MOURELLE, D. et al. Hyperalgesic and edematogenic effects of Secapin-2, a peptide isolated from Africanized honeybee (*Apis mellifera*) venom. **Peptides**, v. 59, p. 42–52, 2014.

NAMBU, A. et al. Dynamic Model of Basal Ganglia Functions and Parkinson ' S Disease. p. 307–312, 1990.

NAMBU, A. et al. Corticosubthalamic input zones from forelimb representations of the dorsal and ventral divisions of the premotor cortex in the macaque monkey: Comparison with the input zones from the primary motor cortex and the supplementary motor area. **Neuroscience Letters**, v. 239, n. 1, p. 13–16, 1997.

NAMBU, A.; TOKUNO, H.; TAKADA, M. Functional significance of the cortico Á subthalamo Á pallidal “ hyperdirect ” pathway. v. 43, p. 111–117, 2002.

NGUYEN, H. M. et al. Intracellular trafficking of the KV1.3 potassium channel is regulated by the prodomain of a matrix metalloprotease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 9, p. 6451–6464, 2013.

NICARETTA, D. H.; PEREIRA, J. S.; PIMENTEL, M. L. V. Distúrbios autonômicos na doença de Parkinson. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 44, n. 2, p. 120–122, 1998.

NISBET, H. O. et al. Research in Veterinary Science Evaluation of bee venom and hyaluronic acid in the intra-articular treatment of osteoarthritis in an experimental rabbit model. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p. 488–493, 2012.

NUZZO, D. et al. Inflammatory mediators as biomarkers in brain disorders. **Inflammation**, v. 37, n. 3, p. 639–648, 2013.

OLIVARES, D. et al. N-Methyl D-Aspartate (NMDA) Receptor Antagonists and Memantine Treatment for Alzheimer's Disease, Vascular Dementia and Parkinson's Disease,. **Curr Alzheimer Res.**, v. 9, n. 6, p. 746–758, 2012.

PALMA, M. S. Peptides as toxins/defensins. **Amino Acids**, v. 40, n. 1, p. 1–4, 2011.
PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. 2ed. ed. [s.l.] Gulf Professional Publishing, 2004.

PERETZ, C. et al. Comparison of selegiline and rasagiline therapies in Parkinson disease: A real-life study. **Clinical Neuropharmacology**, v. 39, n. 5, p. 227–231, 2016.

PERFEITO, R.; REGO, A. C. Papel da alfa-sinucleína e da disfunção mitocondrial associada à doença de Parkinson. **Revista Neurociencias**, v. 20, n. 2, p. 273–284, 2012.

PEROVIC, M.; RAIC, N. 6-Hydroxydopamine increases the level of TNF α and bax mRNA in the striatum and induces apoptosis of dopaminergic neurons in hemiparkinsonian rats. v. 996, p. 237–245, 2004.

PERRY, T. et al. A Novel Neurotrophic Property of Glucagon-Like Peptide 1: A Promoter of Nerve Growth Factor-Mediated Differentiation in PC12 Cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 3, p. 958–966, 2002.

PHANI, S.; LOIKE, J. D.; PRZEDBORSKI, S. Neurodegeneration and Inflammation in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 18, Supple, p. S207–S209, 2012.

PIEK, T. Neurotoxic kinins from wasp and ant venoms. **Toxicon**, v. 29, n. 2, p. 139–149, 1991.

PINTO, W. B. V. DE R.; KO, G. M. Teste De Rotarod: Contribuições No Estudo Das Doenças Neuromusculares, Das Síndromes Extrapiramidais E Das Ataxias Cerebelares. **Resbcal**, v. 1, n. 2, p. 202–212, 2012.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1–21, 2017.

POST, M. R.; LIEBERMAN, O. J.; MOSHAROV, E. V. Can interactions between α -synuclein, dopamine and calcium explain selective neurodegeneration in Parkinson's disease? **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. MAR, p. 1–11, 2018.

PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 11, n. SUPPL. 1, p. 3–7, 2005.

QUIROGA-VARELA, A. et al. What basal ganglia changes underlie the parkinsonian state? The significance of neuronal oscillatory activity. **Neurobiology of Disease**, v. 58, p. 242–248, 2013.

RANGARAJU, S. et al. Potassium channel modulation by a toxin domain in matrix metalloprotease 23. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 12, p. 9124–9136, 2010.

RANGEL, M. et al. Chemical and biological characterization of four new linear cationic α -helical peptides from the venoms of two solitary eumenine wasps. **Toxicon**, v. 57, n. 7–8, p. 1081–1092, 2011.

RASOLA, A.; BERNARDI, P. Mitochondrial permeability transition in Ca

2+-dependent apoptosis and necrosis. **Cell Calcium**, v. 50, n. 3, p. 222–233, 2011.

RAY CHAUDHURI, K. et al. Non-oral dopaminergic therapies for Parkinson's disease: current treatments and the future. **npj Parkinson's Disease**, v. 2, n. 1, p. 16023, 2016.

REINER, A.; ISACOFF, E. Y. Tethered ligands reveal glutamate receptor desensitization depends on subunit occupancy. **Nat. Chem. Biol.**, v. 10, n. 4, p. 273–80, 2014.

REYNOLDS, A. D. et al. Nitrated Alpha Synuclein Induced Alterations in Microglial Immunity is Regulated by CD4+ T Cell Subsets. v. 182, n. 7, p. 4137–4149, 2009.

RICHARDS, O. The social wasps of the Americas excluding the Vespinae. In: **London British Museum (Natural History)**. [s.l: s.n.]. p. 580.

RIZEK, P.; KUMAR, N.; JOG, M. S. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. **Canadian Medical Association Journal**, v. 188, n. 16, p. 1157–1165, 2016.

RODRÍGUEZ, D.; MORRISON, C. J.; OVERALL, C. M. Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 1, p. 39–54, 2010.

SCHWAB, C.; MCGEER., P. L. Inflammatory aspects of Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 13, n. 4, p. 359–369, 2008.

SCHWARTING, R. K. W.; HUSTON, J. P. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. **Progress in Neurobiology**, v. 49, n. 3, p. 215–266, 1996.

SHIGERI, Y.; SEAL, R. P.; SHIMAMOTO, K. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. **Brain Research Reviews**, v. 45, n. 3, p. 250–265, 2004.

SHIMOHAMA, S. et al. Disease model: Parkinson's disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 8, p. 360–365, 2003.

SHIN, E. J. et al. Matrix metalloproteinase-3 is activated by HtrA2/Omi in dopaminergic cells: Relevance to Parkinson's disease. **Neurochemistry International**, v. 60, n. 3, p. 249–256, 2012.

SHIOMI, K. Novel peptide toxins recently isolated from sea anemones. **Toxicon**, v. 54, n. 8, p. 1112–1118, 2009.

SHIOTSUKI, H. et al. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 189, n. 2, p. 180–185, 2010.

SINHA, V. R.; TREHAN, A. Biodegradable microspheres for protein delivery. **Journal**

of Controlled Release, v. 90, n. 3, p. 261–280, 2003.

SU, X. et al. Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 29, n. 11, p. 1690–1701, 2008.

SURMEIER, D. J. et al. The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 198, p. 221–231, 2011.

SWEDBERG, J. E. et al. Truncated glucagon-like peptide-1 and exendin-4 α -conotoxin p14a peptide chimeras maintain potency and α -helicity and reveal interactions vital for cAMP signaling in vitro. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 30, p. 15778–15787, 2016.

SZATMARI, S. et al. Neuropsychiatric symptoms in untreated Parkinson's disease. p. 815–826, 2017.

SZYDLOWSKA, K.; TYMIANSKI, M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. **Cell Calcium**, v. 47, n. 2, p. 122–129, 2010.

TAKAKUSAKI, K. et al. Role of basal ganglia-brainstem pathways in the control of motor behaviors. **Neuroscience Research**, v. 50, n. 2, p. 137–151, 2004.

TALATI, R. et al. Pharmacologic treatment of advanced Parkinson's disease: A meta-analysis of COMT inhibitors and MAO-B inhibitors. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 15, n. 7, p. 500–505, 2009.

TANSEY, M. G.; GOLDBERG, M. S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: Its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. **Neurobiology of Disease**, v. 37, n. 3, p. 510–518, 2010.

TAYLOR, J. M.; MAIN, B. S.; CRACK, P. J. Neuroinflammation and oxidative stress: Co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 5, p. 803–819, 2013.

TAYLOR, K. S. M.; COOK, J. A.; COUNSELL, C. E. Heterogeneity in male to female risk for Parkinson's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 78, p. 905–912, 2007.

TEIVE, H. A. G. Etiopatogenia da Doença de Parkinson. **Neurociências**, v. 13, n. 4, p. 21–214, 2005.

TEIVE, L. I. O. A. G. O papel de charcot na doença de parkinson. v. 56, n. 1, p. 141–145, 1998.

TRONCI, E. et al. EFFECT OF MEMANTINE ON L-DOPA-INDUCED DYSKINESIA IN THE 6-OHDA-LESIONED RAT MODEL OF PARKINSON'S DISEASE. **NEUROSCIENCE**, v. 265, p. 245–252, 2014.

TROUTMAN, T. D.; BAZAN, J. F.; PASARE, C. Toll-like receptors, signaling adapters

and regulation of the pro-inflammatory response by PI3K. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 11, n. 19, p. 3559–67, 2012

TURNER, R. S.; DESMURGET, M. Basal ganglia contributions to motor control: A vigorous tutor. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 20, n. 6, p. 704–716, 2010.

UEBERHEIDE, B. M. et al. Rapid sensitive analysis of cysteine rich peptide venom components. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 17, p. 6910–5, 2009.

UHLIG, T. et al. The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. **EuPA Open Proteomics**, v. 4, p. 58–69, 2014.

UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxy-Dopamine Induced Degeneration of Central Monoamine Neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 107–110, 1968.

VIJAYAKUMAR, D.; JANKOVIC, J. Drug-Induced Dyskinesia, Part 1: Treatment of Levodopa-Induced Dyskinesia. **Drugs**, v. 76, n. 7, p. 759–777, 2016.

VU, T. H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: Effectors of development and normal physiology. **Genes and Development**, v. 14, n. 17, p. 2123–2133, 2000.

WALSH, S.; FINN, D. P.; DOWD, E. Time-course of nigrostriatal neurodegeneration and neuroinflammation in the 6-hydroxydopamine-induced axonal and terminal lesion models of Parkinson's disease in the rat. **Neuroscience**, v. 175, p. 251–261, 2011.

WANG, XUE-FENG, LIU, A QIAN, YU-HONG WANG, B SHUAI WANG, A JIE CHEN, A YUE-ZHI LIN, A JIAN MA, A JIAN-HUA ZHOU, A.; WANG, X. Characterization of Equine Infectious Anemia Virus Long Terminal Repeat Quasispecies In Vitro and In Vivo. **Journal of Virology**, v. 92, n. 8, 2018.

WILMS, H. et al. Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 17, n. 6, p. 500–502, 2003.

WYSS-CORAY, T.; MUCKE, L. Inflammation in Neurodegenerative Disease — A Double-Edged Sword. v. 35, p. 419–432, 2002.

XU, D.; ZHANG, Y. Ab Initio Protein Structure Assembly Using Continuous Structure Fragments and Optimized Knowledge-based Force Field. **Proteins**, v. 80, n. 7, p. 1715–1735, 2012.

XU, X.; NELSON, J. W. Solution Structure of Tertiapin Determined Using Nuclear Magnetic Resonance and Distance Geometry. **PROTEINS Structure, Function, and Genetics**, v. 17, p. 124–137, 1993.

YOUDIM, M. B. H. et al. Promises of novel multi-target neuroprotective and neurorestorative drugs for Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 20, n. SUPPL.1, p. 132–136, 2014.


YOUDIM, M. B. H.; GELDENHUYS, W. J.; VAN DER SCHYF, C. J. Why should we use multifunctional neuroprotective and neurorestorative drugs for Parkinson's disease? **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 13, n. SUPPL. 3, 2007.

ZECCA, L. et al. Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: Implications for Parkinson's disease. **Acta Neuropathologica**, v. 116, n. 1, p. 47–55, 2008.


ZHANG, W. et al. Neuromelanin activates microglia and induces degeneration of dopaminergic neurons: implications for progression of Parkinson's disease. **Neurotox Res.**, v. 19, n. 1, p. 63–72, 2011.

ANEXOS


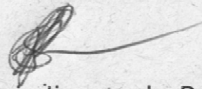
Anexo 1 – Declaração de aprovação da pesquisa científica pelo Comitê de ética (UnBDoC).


Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 18 de agosto de 2014.


DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **“AVALIAÇÃO ANTIPARKINSONIANA E DO MECANISMO DE AÇÃO DE PEPTÍDEOS ISOLADOS DE VESPAS SOCIAIS E DE ANÁLOGOS SINTÉTICOS”**, UnBDoC n.º 79100/2014, sob responsabilidade da Professora Márcia Renata Mortari foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Msc. MV. José Luiz Jivago de Paula Rôlo
Vice Coordenador da CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

Anexo 2- Licença do uso de radioativos



Serviço Público Federal
Ministério da Ciência e Tecnologia
Comissão Nacional de Energia Nuclear

Ofício: 5943/2013- CGMI/CNEN

Rio de Janeiro, 15/05/2013

Ilma. Sra. ELISABETH NOGUEIRA FERRONI SCHWARTZ
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, S NUMERO - CAMPUS DARCY RIBEIRO
ASA NORTE
CEP.: 70910-900 BRASÍLIA - DF

Assunto: **Ofício de Isenção de Requisitos de Proteção Radiológica**

Prezada Senhora,

Informamos que, após atendimento ao disposto no **subitem 3.2.3 b) e subitem 3.2.5 i)** do item 3.2 da Posição Regulatória 3.01/001 (critérios de Exclusão, Isenção e Dispensa de Requisitos de Proteção Radiológica) da Norma CNEN-NN - 3.01 - "Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica", publicada no D.O.U. de 26 de novembro de 2005, em vigor, Vossa Senhoria teve DEFERIDA sua solicitação para Isenção de Requisitos de Proteção Radiológica para as seguintes fontes de radiação:

| Fonte | Atividade | Limite para Isenção |
|------------|-------------------------------|---------------------|
| H-3 | Abaixo de 3 µCi -Total | 27 mCi |

Esclarecimentos adicionais, bem como modelos de requerimentos e guia de recolhimento, estão disponíveis na página da CNEN na internet, no endereço <http://www.cnem.gov.br>.

Atenciosamente,

Maria Helena Marechal
Coordenadora Geral
Coordenação Geral de Instalações
Médicas e Industriais

Maria Helena da Hora Marechal
Coordenadora Geral
Coordenação Geral de Instalações Médicas e Industriais

Coordenação Geral de Instalações Médicas e Industriais
Rua General Severiano, 90 - Botafogo - Rio de Janeiro - RJ - Brasil - CEP: 22290-901
Tel.: +55 21 2173 2321 / Telefax: +55 21 21732323

Anexo 3. Certificação da pureza dos peptídeos do peptídeo Fraternina-24



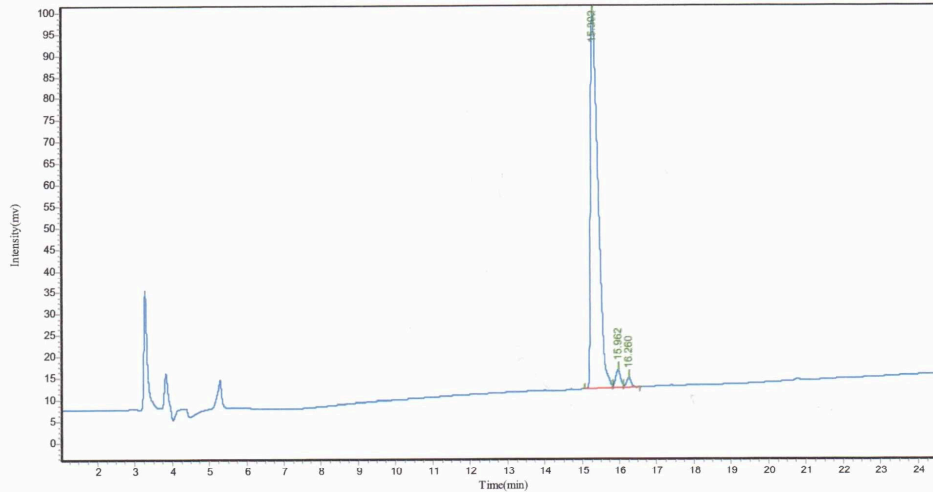
Toll Free: +1-844-WASTONBio (928-7662)
 Fax: +1-832-665-2083
<http://www.watsonbio.com>
 Contact: info@watsonbio.com

HPLC Report

Structure: LC-24
Sequence: [NH2]-LSFQKVKEKVCKVAEKLGGKLPFC-Amid
Order ID: 101053-1
Lot No: P160331-VZ508075
Column: 4.6×250 mm, Diamonsil 5um C18
Solvent A: 0.1% trifluoroacetic in 100% acetonitrile
Solvent B: 0.1% trifluoroacetic in 100% water
Gradient:

| | A | B |
|---------|------|-----|
| 0.01min | 25% | 75% |
| 25min | 50% | 50% |
| 25.1min | 100% | 0% |
| 30min | STOP | |

Flow rate: 1.0 mL/min
Wavelength: 220 nm
Volume: 5 µl



| Peak No. | Ret Time | Height | Area | Conc. |
|----------|----------|-----------|-------------|----------|
| 1 | 15.302 | 87395.703 | 1215438.375 | 95.3650 |
| 2 | 15.962 | 4166.338 | 39645.031 | 3.1106 |
| 3 | 16.260 | 2214.365 | 19428.006 | 1.5243 |
| Total | | | | 100.0000 |

Anexo 4. Certificação da análise por espectrometria de massa do peptídeo Fraternina-24



Toll Free: +1-844-WASTONBio (928-7662)
Fax: +1-832-665-2083
<http://www.watsonbio.com>
Contact: info@watsonbio.com

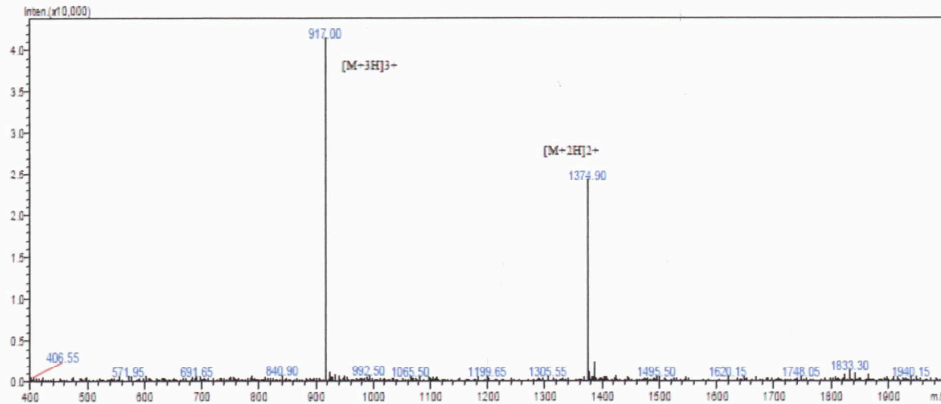
Mass Spectrum Report

Order ID: 101053-1
Sequence: [NH₂]-LSFQKVKKEKVKVAEKLGGKLPFC-Amid

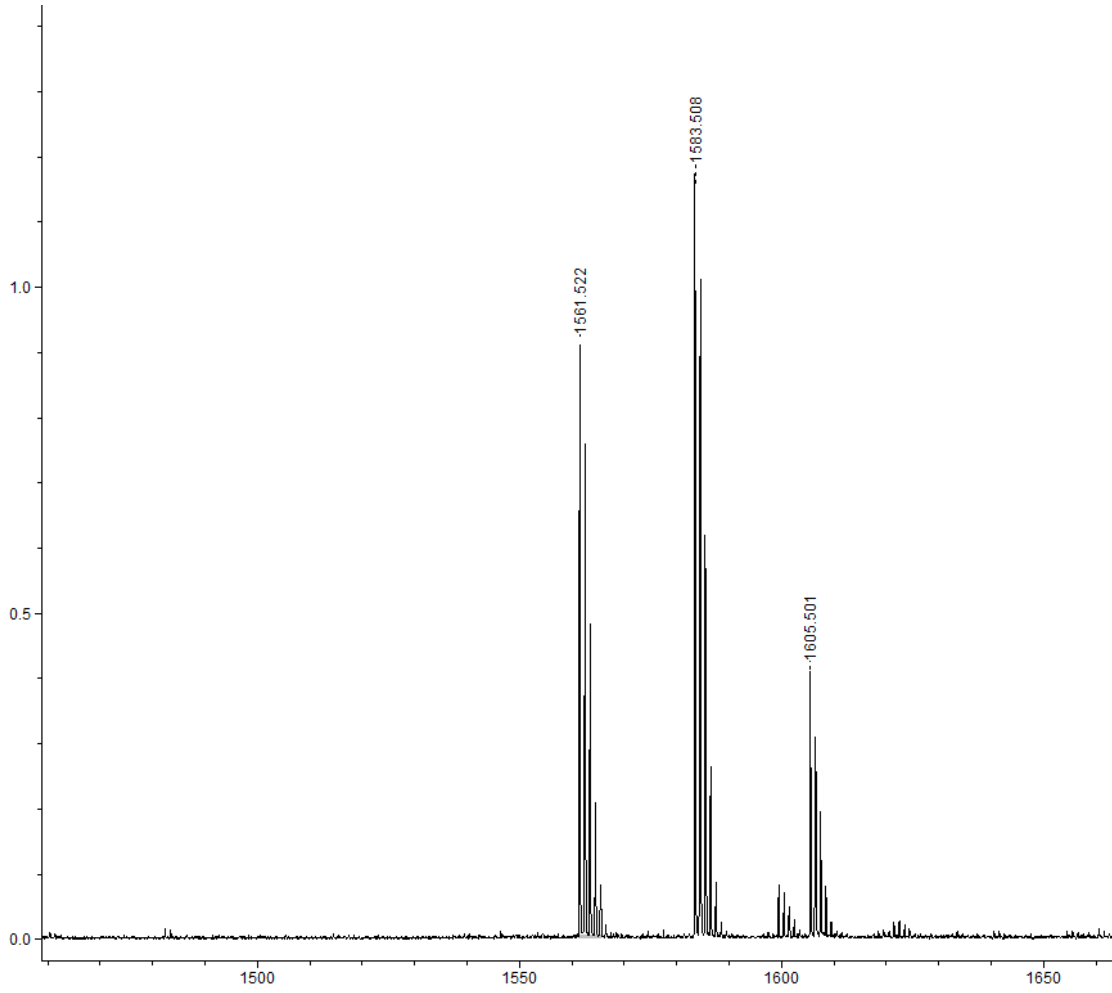
Data Acquired: 4/16/2016
Acquired by: CHAO
Injection Volume: 1
Sample Name: 101053-1
MW: 2748.68
Lot No.: P160331-VZ508075

Probe: ESI
Nebulizer Gas Flow: 1.5 L/min
CDL: -20.0 V
CDL Temp: 250 °C
Block Temp: 200 °C

Probe bias: +4.5 kv
Detector: 1.5 kv
T.Flow: 0.2 mL/min
B.conc: 50%H₂O/50%ACN



Anexo 5. Certificação da pureza do peptídeo do peptídeo Fraternina-14



Anexo 6. Certificação da análise por espectrometria de massa do peptídeo Fraternalina-14



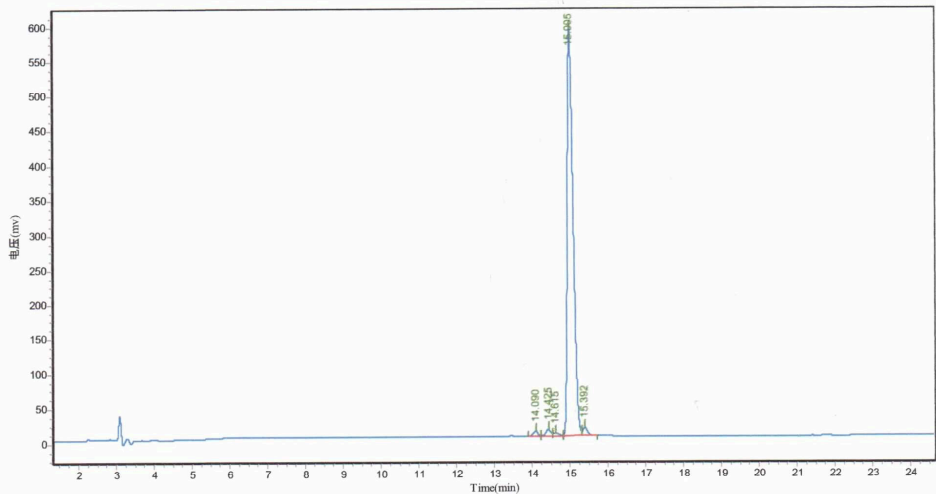
Toll Free: +1-844-WASTONBio (928-7662)
 Fax: +1-832-665-2083
<http://www.watsonbio.com>
 Contact: info@watsonbio.com

HPLC Report

Structure: LV-10
Sequence: [NH2]-LSFQKVKEKV-Amid
Order ID: 101048-1
Lot No: P160330-VZ507322
Column: 4.6×250 mm, Diamonsil 5um C18
Solvent A: 0.1% trifluoroacetic in 100% acetonitrile
Solvent B: 0.1% trifluoroacetic in 100% water
Gradient:

| | A | B |
|---------|------|-----|
| 0.01min | 10% | 90% |
| 25min | 35% | 65% |
| 25.1min | 100% | 0% |
| 30min | STOP | |

Flow rate: 1.0 mL/min
Wavelength: 220 nm
Volume: 5 µl



| Peak No. | Ret Time | Height | Area | Conc. |
|----------|----------|------------|-------------|----------|
| 1 | 14.090 | 7122.688 | 54372.465 | 0.8381 |
| 2 | 14.425 | 9040.689 | 83439.172 | 1.2861 |
| 3 | 14.615 | 4273.839 | 43328.609 | 0.6679 |
| 4 | 15.005 | 586269.875 | 6200877.500 | 95.5807 |
| 5 | 15.392 | 11162.066 | 105563.281 | 1.6272 |
| Total | | | | 100.0000 |

Anexo 7. Certificação da pureza do peptídeo Fraternina-10



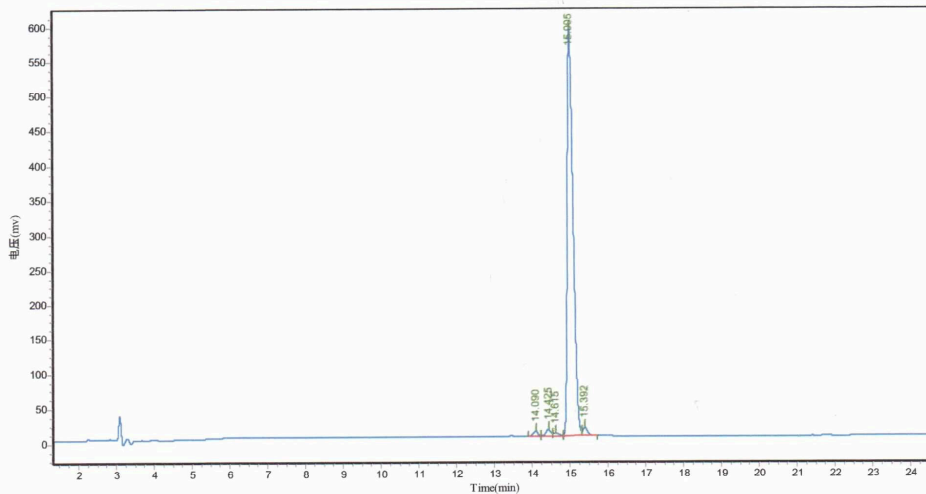
Toll Free: +1-844-WASTONBio (928-7662)
 Fax: +1-832-665-2083
<http://www.watsonbio.com>
 Contact: info@watsonbio.com

HPLC Report

Structure: LV-10
Sequence: [NH2]-LSFQKVKEKV-Amid
Order ID: 101048-1
Lot No: P160330-VZ507322
Column: 4.6×250 mm, Diamonsil 5um C18
Solvent A: 0.1% trifluoroacetic in 100% acetonitrile
Solvent B: 0.1% trifluoroacetic in 100% water
Gradient:

| | A | B |
|---------|------|-----|
| 0.01min | 10% | 90% |
| 25min | 35% | 65% |
| 25.1min | 100% | 0% |
| 30min | STOP | |

Flow rate: 1.0 mL/min
Wavelength: 220 nm
Volume: 5 µl



| Peak No. | Ret Time | Height | Area | Conc. |
|----------|----------|------------|-------------|----------|
| 1 | 14.090 | 7122.688 | 54372.465 | 0.8381 |
| 2 | 14.425 | 9040.689 | 83439.172 | 1.2861 |
| 3 | 14.615 | 4273.839 | 43328.609 | 0.6679 |
| 4 | 15.005 | 586269.875 | 6200877.500 | 95.5807 |
| 5 | 15.392 | 11162.066 | 105563.281 | 1.6272 |
| Total | | | | 100.0000 |

Anexo 8. Certificação da análise por espectrometria de massa do peptídeo Fraternina-10



Toll Free: +1-844-WASTONBio (928-7662)
Fax: +1-832-665-2083
<http://www.watsonbio.com>
Contact: info@watsonbio.com

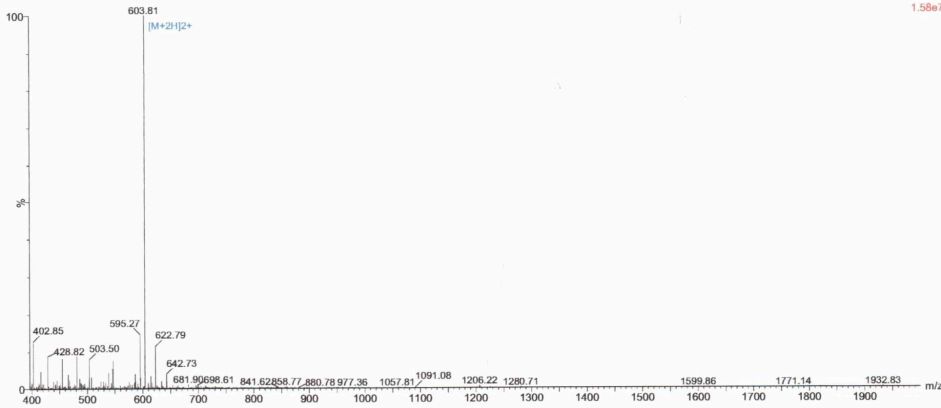
Mass Spectrum Report

Order ID: 101048-1
Sequence: [NH2]-LSFQKVKEKV-Amid


Data Acquired: 4/11/2016
Acquired by: YU
Injection Volume: 1
Sample Name: 101048-1
MW: 1204.49
Lot No.: P160330-VZ507322

Probe: ESI
Nebulizer Gas Flow: 1.5 L/min
CDL: -20.0 V
CDL Temp: 250 °C
Block Temp: 200 °C

Probe bias: +4.5 kv
Detector: 1.5 kv
T.Flow: 0.2 mL/min
B.conc: 50%H₂O/50%ACN



Anexo 9. Autorização de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético

| | |
|--|---|
|  <p>Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético</p> <p>O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autoriza a instituição identificada no verso deste documento a acessar e remeter componente do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica.</p> <p>Brasília, 19 de Novembro de 2013</p> <p>Raquel de Andrade Lima Coelho Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde PO 161/2010</p> | <p>Processo: 010476/2013-0 Validade: 19/11/2013 a 01/08/2018 Instituição: UNIVERSIDADE DE BRASILIA CNPJ: 000.381.740/0001-43 Pesquisador: Márcia Renata Mortari CPF: 828.885.151-72 RG: 1507428 - SSP / DF</p> <p><i>Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/ e informar o número do protocolo 8904338536066393 para recuperá-la do banco de dados do CNPq</i></p> |
|--|---|

Anexo 10. Comprovante de cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado.



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A8AF8A0

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A8AF8A0**
 Usuário: **Márcia Renata Mortari**
 CPF/CNPJ: **828.885.151-72**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Parachartergus fraternus

Título da Atividade: **PEPTÍDEOS MODIFICADOS DA PEÇONHA DA VESPA SOCIAL**
Parachartergus fraternus E SEU USO NO TRATAMENTO DE DOENÇAS
NEURODEGENERATIVAS

Equipe

| | |
|------------------------------|---------------------------------|
| Márcia Renata Mortari | Universidade de Brasília |
| Andreia Biolchi Mayer | Universidade de Brasília |

Data do Cadastro: **25/04/2018 15:43:22**
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **15:43** de **25/04/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

Anexo 11. Artigos