



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



**Avaliação da ação antiparkinsoniana do peptídeo
Neurovespina no modelo murino da Doença de
Parkinson**

Gabriel Avohay Alves Campos

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Márcia Renata Mortari

Brasília, DF

2016

Gabriel Avohay Alves Campos

**Avaliação da ação antiparkinsoniana do peptídeo Neurovespina
no modelo murino da Doença de Parkinson**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Biologia Animal da Universidade
de Brasília para obtenção do título de Mestre
em Biologia Animal.

Área de concentração: Neurociências

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Renata Mortari

Brasília, DF

2016

Agradecimentos

A Deus, pelo amor incondicional.

À minha mãe Elizabete e ao meu pai Alfeu, pelo amor, carinho, dedicação, cuidado e apoio sempre. Por me incentivarem a seguir meus sonhos e minhas escolhas. Pelo exemplo que ambos sempre me deram.

À Laura, pelo carinho, apoio, incentivo e amor. Por me fazer tão feliz.

À minha orientadora Márcia, pela dedicação, pelos ensinamentos e em especial por toda paciência.

A todos os amigos com os quais a vida me presenteou. Citar nomes seria uma injustiça, por isso agradeço a todos da mesma forma de coração.

Às minhas estagiárias, pela ajuda incomparável e pelas risadas.

A todas as meninas da Neurofarmacologia (além de eventuais meninos ou dissidentes), pelos dias alegres, pela ajuda e companheirismo. Pelos extensos conhecimentos compartilhados.

A todos os colegas do CFS, pelos cafés e churrascos sempre bem-vindos.

Aos professores Elisabeth Ferroni, Carlos Schwartz e Antônio Sebben, pelos ensinamentos e pela companhia.

Aos técnicos pela ajuda e disponibilidade.

Aos funcionários do Instituto de Biologia.

Ao CNPq, à CAPES e à FAPDF, pelo apoio financeiro.

Ao PPG BioAni, pela oportunidade.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de figuras e tabelas

Resumo

Abstract

1.	Introdução	1
1.1-	Histórico, epidemiologia e sintomatologia da Doença de Parkinson.....	1
1.2-	Neurobiologia do controle motor.....	3
1.3-	Vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos	6
1.4-	Abordagens Terapêuticas da DP.....	7
1.4.1-	Tratamento atual clássico	7
1.4.2-	Nova geração de fármacos envolvidos com diversos neurotransmissores ...	9
1.4.3-	Abordagens neuroprotetoras.....	11
1.5-	Neurovespina.....	17
2.	Justificativa	18
3.	Objetivos.....	19
3.1-	Objetivo Geral	19
3.2-	Objetivos Específicos	19
4.	Materiais e Métodos	20
4.1-	Bioensaios.....	20
4.1.1-	Neurocirurgia.....	20
4.1.2-	Cuidados pós-operatórios	21
4.1.3-	Protocolo experimental.....	22
4.1.4-	Preparo do peptídeo	25
4.1.5-	Comprometimento Motor	25

4.1.6- Avaliação sensório-motora	26
4.1.7- Rotações induzidas por apomorfina	26
4.2- Avaliação Imunoistoquímica	27
4.3- Análises Estatísticas.....	29
5. Resultados	32
5.1- Protocolo Experimental.....	32
5.2- Sequência do Peptídeo.....	33
5.3- Comprometimento Motor	35
5.4- Remoção de Fita Adesiva	38
5.5- Apomorfina.....	40
5.6- Contagem de Neurônios.....	40
5.7- Densidade Ótica Estriatal	45
6. Discussão	47
7. Conclusões.....	54
8. Referências Bibliográficas.....	55
9. Apêndice.....	65

Lista de abreviaturas

α -Sin	α -sinucleína
6-OHDA	6- hidroxidopamina
DA	Dopamina
DP	Doença de Parkinson
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
ROS	Espécie reativa de oxigênio
s.c.	Subcutâneo
SNc	Substância Negra <i>pars compacta</i>
THr	Tirosina Hidroxilase reativo
VTA	Área Tegumentar Ventral

Lista de Figuras e Tabelas

- Figura 1.** Organograma evidenciando as duas vias de retroalimentação envolvendo os núcleos da base para o controle da atividade cortical, tanto no estado normal (a) quanto no parkinsonismo (b). GPe= Globo Pálido externo; GPi= Globo Pálido interno; NST= Núcleo Subtalâmico; SNC= Substância Negra pars compacta; SNr= Substância Negra pars reticulata; (adaptado de Cenci, 2007). 5
- Figura 2.** Representação das principais vias citotóxicas associadas à morte de neurônios dopaminérgicos na DP: **1)** Neuroinflamação **2)** Excitotoxicidade glutamatérgica **3)** Distúrbios na homeostase de cálcio **4)** Disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e apoptose **5)** Diminuição do aporte de fatores neutróficos **6)** Acúmulo de formas tóxicas da proteína α -Sin **7)** Aumento da atividade da quinase LRRK2 **8)** Distúrbios na homeostase de ferro. Adaptado de AlDakheel et al, 2014. 16
- Figura 3.** Estrutura primária do peptídeo Neurovespina. 17
- Figura 4.** (A) Representação do local aproximado (círculo branco) de infusão do composto 6-OHDA por meio de cirurgia estereotáxica. Em verde a região do estriado, em rosa a Substância Negra e em laranja projeções unilaterais da SN para o estriado. À direita (B) cirurgia estereotáxica; seta representando alinhamento da agulha de infusão com o Bregma para realização das medidas estereotáxicas. Imagem à esquerda gerada no programa Brain Explorer- Allen Institute. 21
- Figura 5.** *Linha temporal evidenciando o momento em que cada ensaio comportamental foi realizado e os dois regimes de tratamento primeiramente testados. Em vermelho o regime de Pré-Lesão, com os animais sendo tratados 30 minutos antes da lesão e 24 e 48 horas após a lesão. Em verde o Pós-Lesão, no qual os animais foram tratados 24, 48 e 72 horas após a lesão com 6-OHDA. Eixo horizontal representado os dias de cada evento (D0 a D21).* 24
- Figura 6.** Exemplo de um neurônio THr, em aumento de 1000x, considerado viável para contagem de células. Em verde marcação anti-TH e em azul coloração DAPI. Barra de escala de 20 μ m. 28
- Figura 7.** Demonstração de imunomarcação anti-TH na região do estriado, mostrando à esquerda o lado contralateral sadio e à direita o lado ipsilateral lesado. Destaque em A

para a região de fundo considerada para as análises de Densidade Ótica e em B a Região de Interesse.	29
Figura 8. Latência de queda (% em relação ao tempo máximo) dos animais tratados segundo o regime de administração intitulado Pré-Lesão (30 minutos antes da lesão por 6-OHDA e 24h e 48h após a lesão), ao qual não foi dado seguimento.....	32
Figura 9. Espectro de Massas da Neurovespina fornecido pela empresa Aminotech Desenvolvimento e Tecnologia Ltda. Massa monoisotópica (M+H ⁺) de 1209,949 Da. .	34
Figura 10. Sequenciamento do peptídeo Neurovespina através da técnica de MALDI-MS/MS em modo LIFT. Análise feita com uso do programa FlexControl 3.0.	34
Figura 11. Avaliação do comprometimento motor em termos da latência de queda (% em relação ao máximo) ao logo do experimento a partir do dia da cirurgia (D0) até o dia D18. Análise estatística feita por ANOVA de duas vias para medidas repetidas com pós-teste de Dunnett. Resultados expressos como média ± EPM. Diferenças significativas em comparação com o controle Lesado. Sadio: ++++=p<0,0001. Neurovespina 7mg/kg: #=p<0,05; ##=p<0,01. Neurovespina 4mg/kg: *= p<0,05; **= p<0,01; ***= p<0,001. .	36
Figura 12. Avaliação de Área Abaixo da Curva dos dados de latência de queda, medida em unidades arbitrárias. Análises estatísticas feitas por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett. Resultados expressos como média ± EPM. Diferenças significativas em comparação com o grupo controle Lesado. *= p<0,05; ****= p<0,0001.	37
Figura 13. Avaliação do comprometimento sensório-motor em termos da latência de retirada de fita adesiva (% em relação ao máximo) no dia da cirurgia (D0) e nos dias D4, D11 e D18. Análise estatística feita por meio de ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida de pós-teste de Dunnett. Resultados expressos como média ± EPM. Diferenças significativas em comparação com o grupo controle Lesado. Sadio: **= p<0,01. Neurovespina 4mg/kg: ##= p<0,01.	38
Figura 14. Avaliação de Área Abaixo da Curva dos dados de latência de retirada, medida em unidades arbitrárias. Análise estatística por Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn. Resultados expressos como média ± EPM. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada.	39
Figura 15. Rotações contralaterais por minuto induzidas pelo agonista dopaminérgico apomorfina. Análise estatística feita por Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn.	

Resultados expressos como média ± EPM. Diferenças significativas em relação ao controle Lesado.	40
Figura 16. Comparação entre a quantidade de neurônios THr na Substância Negra do lado ipsilateral (lesado) e a do lado contralateral (sadio) em cada grupo experimental. Resultados expressos como média ± EPM. Análise estatística feita por Mann-Whitney. *= p<0,5; **= p<0,01	41
Figura 17. Comparação entre a quantidade de neurônios THr na Área Tegmentar Ventral do lado ipsilateral (lesado) e a do lado contralateral (sadio) em cada grupo experimental. Resultados expressos como média ± EPM. Análise estatística feita por Mann-Whitney. *= p<0,5; **= p<0,01; ***= p<0,001.....	42
Figura 18. Avaliação da porcentagem de neurônios THr remanescentes na SN em relação ao lado contralateral. Análise estatística por Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn. Resultados expressos como média ± EPM. Diferença significativa em comparação com o grupo controle Lesado. *= p<0,05; **= p<0,01.....	43
Figura 19. Avaliação da porcentagem de neurônios THr remanescentes na VTA em relação ao lado contralateral. Análise estatística por Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn. Resultados expressos como média ± EPM. Diferença significativa em comparação com o grupo controle Lesado. **= p<0,01.....	43
Figura 20. Prancha com cortes representativos da região das Substância Negra da VTA para cada um dos grupos experimentais, com o lado contralateral à lesão (sadio) à esquerda e o lado ipsilateral à lesão (lesado) à direita.	44
Figura 21. Comparação da Densidade Ótica estriatal entre o lado ipsilateral (lesado) e a do lado contralateral (sadio) em cada grupo experimental. Resultados expressos como média ± EPM. Análise estatística feita por teste t-Student. *= p<0,05.....	45
Figura 22. Avaliação da porcentagem de Densidade Ótica estriatal em relação ao lado contralateral. Análise estatística por Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn. Resultados expressos como média ± EPM. Diferença significativa em comparação com o grupo controle Lesado. *= p<0,05.....	46
Tabela 1. Compostos administrados por via intraestriatal ou por via intraperitoneal (tratamento) de acordo com cada grupo experimental.	23
Tabela 2. Distribuição do tamanho amostral de cada grupo experimental, tanto nos ensaios comportamentais quanto nos ensaios imunoistoquímicos.	33

Resumo

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa implacável e fatal, progressivamente debilitante e que causa uma série de prejuízos para os seus portadores, tanto econômicos quanto sociais e psicológicos. As principais características patológicas da DP são a degeneração de neurônios dopaminérgicos dos Núcleos da Base, em especial da Substância Negra (SN), e a presença de corpos de inclusão eosinófilos no citoplasma dos neurônios, os chamados Corpos de Lewy. A ausência de medicamentos aprovados para uso em humanos capazes de modificar a progressão da doença, somada aos efeitos adversos associados às terapias existentes, traz urgência no desenvolvimento tanto de novas ferramentas no estudo da DP quanto de novos tratamentos mais eficazes ou que modifiquem o curso da doença. Este trabalho teve como objetivo, portanto, avaliar a atividade antiparkinsoniana do peptídeo sintético Neurovespina, análogo a um peptídeo isolado de vespa social, no modelo murino da Doença de Parkinson por injeção unilateral intraestriatal da neurotoxina 6-OHDA. Foram utilizados ensaios para avaliar, após três administrações do peptídeo e durante 22 dias, o efeito de três diferentes doses da Neurovespina. Para tal finalidade, foram realizados os seguintes procedimentos: avaliação do comprometimento motor no equipamento RotaRod, avaliação sensório-motora no teste de remoção de fita, teste de rotações induzidas por apomorfina, além da marcação imunistoquímica da enzima tirosina hidroxilase (TH) na região da SN (e da região VTA anexa à SN) e de projeções dopaminérgicas na região do estriado (Densidade Ótica estriatal). Avaliando-se o comprometimento motor dos animais por meio da aferição da latência de queda dos animais no aparelho RotaRod, o tratamento com Neurovespina nas doses de 7mg/kg e de 4mg/kg resultou em uma diminuição do comprometimento motor induzido pela administração de 6-OHDA, de forma persistente ao longo de todo o período experimental. Na avaliação sensório-motora, somente foi possível observar diferenças significativas do grupo Sadio e o tratado com 4mg/kg em comparação com o grupo Lesado no último dia de experimento. O teste de rotações induzidas por apomorfina demonstrou diferença significativa somente entre os controles Sadio e Lesado, além de uma leve diminuição na média de rotações do grupo tratado com 7mg/kg (não significativa). Na análise de neurônios THr remanescentes (porcentagem em relação ao lado contralateral) na SN, foi observada diferença significativa entre as médias do tratamento com 4mg/kg e o controle Lesado, indicando ação neuroprotetora do peptídeo em neurônios dopaminérgicos nessa dose. O mesmo, entretanto, não foi observado para a região VTA, tão pouco para a análise Densidade Ótica. Estes dados mostraram que a administração do peptídeo Neurovespina na dose de 4mg/kg foi capaz não só de diminuir a descoordenação motora gerada pela infusão intraestriatal de 6-OHDA como também foi capaz de proteger os neurônios dopaminérgicos da SN, se mostrando uma potencial ferramenta para o estudo da DP e potencial fármaco-modelo para o desenvolvimento de novas moléculas neuroativas.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, neurodegeneração, 6-OHDA

Abstract

Parkinson's Disease (PD) is a relentless, progressively debilitating and fatal neurodegenerative disorder that causes both economic, social and psychological damage in patients with this disorder. The main pathological features of PD are the degeneration of dopaminergic neurons of the basal ganglia, especially the Substantia Nigra (SN), and the presence of eosinophilic inclusion bodies in the cytoplasm of neurons, the so-called Lewy bodies. In addition to the fact that there is no drug approved for use in humans able to modify the progression of the disease, the standard treatment for PD is associated with several adverse effects. This scenario brings urgency in the development of new tools for the study of PD, as well as new treatments that are more effective and able to modify the course of degeneration. Therefore, this study evaluated the antiparkinsonian activity of the synthetic peptide Neurovespina, analogous to a peptide isolated from a social wasp, in the murine model of PD by intrastriatal unilateral injection of the neurotoxin 6-OHDA. For this purpose, several assays were conducted, after three administrations of the peptide and for 22 days, to assess the effect of three different doses of Neurovespina. For such purposes, the following procedures were performed: assessment of motor impairment on the RotaRod equipment, motor-sensory evaluation in the adhesive tape removal test, apomorphine induced rotations test and immunohistochemical labelling of the enzyme tyrosine hydroxylase (TH) of the SN (and VTA region near the SN) and dopaminergic projections into the striatum region (striatum Optical Density). Evaluating motor impairment by measuring the animal's latency to fall in the RotaRod apparatus, Neurovespina at the doses of 7mg/kg and 4 mg/kg resulted in a decrease of the motor impairment induced by the administration of 6-OHDA. Moreover, this effect was persistent throughout the experimental period. In the sensory-motor evaluation by the tape removal test, significant difference between the group treated with 4 mg/kg and the Lesioned group was observed only in the last of three evaluations. The apomorphine-induced rotations test showed a significant difference only between the Sham and Lesioned controls, plus a slight decrease in the average rotations of the group treated with 7 mg / kg (not significant). Analysis of the remaining THr neurons in SN showed significant difference between the treatment with 4 mg / kg and the Lesioned control, indicating a neuroprotective action of the peptide on dopaminergic neurons at this dose. In account of the VTA region and striatal Optical Density, there was no difference between the Lesioned group and the treatments. These data showed that the administration of the Neurovespina peptide at a dose of 4 mg/kg not only reduced the motor impairment generated by intrastriatal infusion of 6-OHDA, but also protected dopaminergic neurons in the SN. This indicates Neurovespina as a potential tool for the study of PD and a potential template molecule for the development of novel neuroactive compounds.

Key words: Parkinson's Disease, neurodegeneration, 6-OHDA

1. Introdução

1.1- Histórico, epidemiologia e sintomatologia da Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurológica que foi primeiramente descrita pelo médico James Parkinson (1817) em seu trabalho intitulado “An Essay on the Shaking Palpsy”, no qual descreveu os principais sinais motores desta doença, que posteriormente foi batizada em sua homenagem (para revisão ver Jankovic, 2008). É a segunda doença neurodegenerativa mais frequente em adultos, estando atrás apenas da Doença de Alzheimer, afetando cerca de 5 milhões de pessoas no mundo (Dorsey et al., 2007).

O principal fator de risco associado à DP é a idade (Van Den Eeden et al., 2003), estimando-se que a prevalência seja de aproximadamente 1% na população acima de 60 anos, podendo alcançar 4% acima de 80 anos (de Lau e Breteler, 2006). Além disso, até 80% dos pacientes com DP podem sofrer concomitantemente de demência (Aarsland et al., 2008), fator associado a um aumento no risco de mortalidade desses pacientes (Levy et al., 2002).

As principais características patológicas da DP são a degeneração de neurônios dopaminérgicos dos Núcleos da Base, em especial da Substância Negra (SN), e a presença de corpos de inclusão eosinófilos no citoplasma de neurônios tanto da SN quanto de outras regiões, os chamados Corpos de Lewy (Braak et al., 2003). A perda de neurônios dopaminérgicos, conseqüentemente, leva a uma diminuição dos níveis desse neurotransmissor na região do estriado, o que está associado aos sinais motores cardinais da doença, que são a bradicinesia (lentidão anormal dos movimentos), a rigidez muscular, o tremor em repouso e a instabilidade postural. Estima-se que os sintomas motores surjam quando há uma diminuição de cerca de 50-60% dos neurônios da SN e denervação de 70-80% para o estriado (Agid, 1991), sendo que o diagnóstico se dá pela avaliação desses sintomas motores, já que ainda não existem biomarcadores efetivos para o diagnóstico da DP (Schapira, 2013).

Uma série de sintomas não motores também estão associados à DP, os quais aparecem principalmente em estágios mais avançados da doença, quando há

pronunciada degeneração celular envolvendo outras regiões encefálicas, afetando assim o equilíbrio de outras neurotransmissões, particularmente as de glutamato, acetilcolina, noradrenalina e serotonina (Braak et al., 2003). No entanto, para uma parcela dos pacientes, alguns sintomas não motores podem ocorrer antecipadamente às manifestações motoras, tais como redução da capacidade olfativa, distúrbios de sono, declínio cognitivo e depressão (Chaudhuri e Schapira, 2009, Siderowf et al., 2012). Estudos de imagem por tomografia computadorizada funcional (PET-scan), por exemplo, estimam que a perda de neurônios dopaminérgicos se dá de forma exponencial e com início aproximado de seis anos antes do diagnóstico (Hilker et al., 2005), deixando clara a importância desse período pré-motor para o diagnóstico da DP e para um tratamento mais efetivo.

Quanto à etiologia, a DP pode se apresentar em uma de duas principais formas, a idiopática ou a familiar. A forma idiopática, que corresponde à maioria dos casos de DP e cuja manifestação dos sintomas se dá entre a quinta e a sexta década de vida, não apresenta uma causa específica delimitada, acreditando-se que essa forma resulte da interação de múltiplos fatores patológicos, tanto genéticos quanto ambientais (OMS, 2006). Por sua vez, a forma familiar está associada a mutações com padrão de herança mendeliana afetando grupos familiares (Schiesling et al., 2008) e, em geral, as primeiras manifestações dos sintomas acontece precocemente em comparação com a forma idiopática, antes dos 50 anos (Hawkes, 2008). Entretanto, as formas familiares da DP são raras, correspondendo somente a 5-10% dos casos (Lesage e Brice, 2009).

Dentre os genes já associados à forma familiar da DP, os genes que codificam as proteínas α -Sinucleína (α -Sin; codificada pelo gene SNCA) e LRRK2 estão implicados em um padrão de herança autossômica dominante, enquanto os que codificam Parkin, PINK1 e DJ-1 apresentam padrão de herança recessiva. Diferentes mutações em Parkin, SNCA e LRRK2 também podem estar presentes na forma idiopática da DP representando fatores de risco para a doença (Lesage e Brice, 2009), podendo assim influenciar no início da manifestação da doença e em sua taxa de progressão (Kumari e Tan, 2009).

Apesar da etiologia da forma idiopática da DP não estar completamente elucidada, é provável que a morte neuronal associada à doença se dê com o envolvimento de diversas vias celulares e moleculares, podendo abranger estresse

oxidativo, disfunção mitocondrial, envelhecimento incorreto e acúmulo de proteínas tóxicas, neuroinflamação, excitotoxicidade glutamatérgica, distúrbios na homeostase de cálcio, predisposições genéticas e ação de toxinas ambientais.

1.2- Neurobiologia do controle motor

O termo Núcleos da Base se refere ao Núcleo Caudado e ao Putâmen (considerados em conjunto como Estriado), ao Globo Pálido (dividido em externo, GPe, e interno, GPi), à Substância Negra (dividida em *pars compacta*, SNc, e *pars reticulata*, SNr) e ao Núcleo Subtalâmico (NST). O circuito motor dos núcleos da base recebe informações corticais via aferências glutamatérgicas para o estriado, a partir do qual populações diferentes de neurônios GABAérgicos emergem dando origem a duas vias de retroalimentação, chamadas de via direta e via indireta (Figura 1).

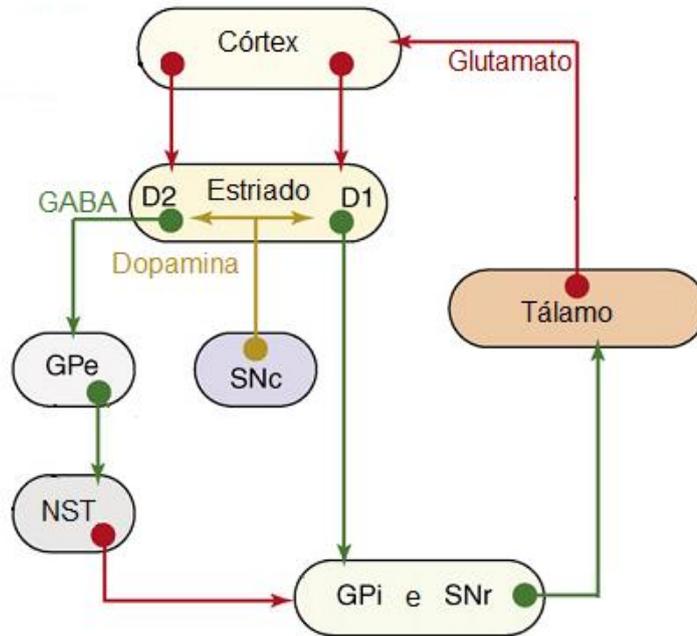
Ambas as vias se comunicam com GPi e SNr, modulando a atividade inibitória, também GABAérgica, que esses núcleos exercem no tálamo, o qual por sua vez se comunica com o córtex por meio de neurotransmissão excitatória glutamatérgica. A partir da via direta, os neurônios estriatais geram inibição de GPi/SNr, diminuindo por sua vez a inibição que estes núcleos geram no tálamo, resultando em um aumento da excitação talâmica no córtex. Já pela via indireta, neurônios estriatais geram inibição de GPe, sendo que esse núcleo inibe o NST via GABA. O NST gera excitação de GPi/SNr por neurotransmissão glutamatérgica, aumentando a inibição desses no tálamo, resultando em diminuição da excitação talâmica no córtex. Desta forma, as duas vias resultam em ações opostas no córtex, sendo que a via direta aumenta a excitabilidade da via tálamo-cortical e a indireta diminui essa excitabilidade.

A SNc, por meio de neurotransmissão dopaminérgica, age nas duas vias modulando a atividade excitatória glutamatérgica cortico-estriatal. No estriado, a população neuronal que dá origem à via direta possui receptores dopaminérgicos do tipo D1, que são excitatórios, ao passo que os neurônios estriatais da via indireta possuem receptores dopaminérgicos do tipo D2, que são inibitórios. Assim, a neurotransmissão dopaminérgica mediada pela SNc age no controle motor de forma

dual, facilitando a atividade excitatória da via direta e diminuindo a atividade inibitória da via indireta.

Considerando esse circuito de controle motor, a degeneração da via nigroestriatal na DP diminui a neurotransmissão dopaminérgica no estriado resultando em aumento da atividade inibitória da via indireta e diminuição da atividade excitatória da via direta, culminando em uma reduzida atividade tálamo-cortical e levando às características motoras do parkinsonismo. Por fim, a depleção de dopamina (DA) em ambas as vias resulta em alterações nas aferências corticais excitatórias dos GB, com consequente prejuízo nas funções motoras voluntárias.

(a) Estado Normal



(b) Parkinsonismo

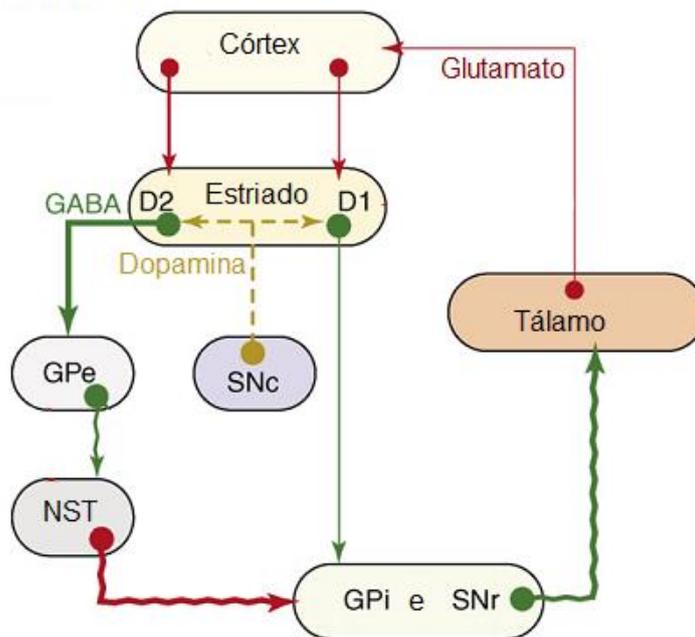


Figura 1. Organograma evidenciando as duas vias de retroalimentação envolvendo os núcleos da base para o controle da atividade cortical, tanto no estado normal (a) quanto no parkinsonismo (b). GPe= Globo Pálido externo; GPi= Globo Pálido interno; NST= Núcleo Subtalâmico; SNc= Substância Negra pars compacta; SNr= Substância Negra pars reticulata; (adaptado de Cenci, 2007).

1.3- Vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos

Vários fatores têm sido associados à morte seletiva de neurônios dopaminérgicos da SNc na Doença de Parkinson. A própria oxidação citosólica de dopamina pode gerar radicais livres e contribuir para o estresse oxidativo, além de induzir toxicidade da α -Sin (Xu et al., 2002), uma proteína citosólica que representa o principal componente dos Corpos de Lewy e que também está associada a formas genéticas da DP. Entretanto, a oxidação da dopamina não pode ser atribuída por si só à neurodegeneração, já que outras populações de neurônios dopaminérgicos não sofrem degeneração da mesma forma que a SNc (Matzuk e Saper, 1985, Damier et al., 1999).

Segundo pesquisas recentes, algumas importantes características intrínsecas dos neurônios dopaminérgicos da SNc poderiam influenciar em sua sensibilidade à degeneração quando comparada a outras regiões. Os neurônios dopaminérgicos dessa região apresentam uma característica atividade tipo marca-passo que permite que eles disparem continuamente, característica essa importante para manter níveis basais de liberação de dopamina e assim manter o comportamento motor. Para essa atividade de marca-passo, esses neurônios se utilizam de canais de cálcio $Ca_v1.3$ do tipo L, que atuam na regulação dos disparos. Entretanto, essa maior condutância ao íon cálcio está associada a um aumento de espécies reativas de oxigênio (do inglês, ROS) mitocondriais e, conseqüentemente, à facilitação de estresse oxidativo, o que é agravado pelos baixos níveis, na SN, de proteínas responsáveis pelo tamponamento desse íon (Guzman et al., 2010, Surmeier et al., 2011).

As altas concentrações de ferro na SNc também podem contribuir na neurodegeneração, já que, além de ser pró-oxidante, o ferro pode potencializar a agregação de α -Sin (Yamin et al., 2003). Um fator que pode estar associado à alta quantidade de ferro na SN é que a neuromelanina, pigmento encontrado em algumas populações de neurônios dopaminérgicos, inclusive os da SNc, se liga com alta eficiência ao ferro, podendo, assim, contribuir para a suscetibilidade desta estrutura na DP (Ben-Shachar et al., 1991, Zecca et al., 2002). Como agravante, os neurônios dopaminérgicos da SN apresentam baixa capacidade antioxidativa, especialmente pelos baixos níveis de glutathione, tornando-os ainda mais suscetíveis ao estresse oxidativo (Zecca et al., 2002).

1.4- Abordagens Terapêuticas da DP

Podem ser delimitadas três possíveis abordagens terapêuticas para a DP: a sintomática, a neuroprotetora e a neurorestauradora. A primeira foca no reestabelecimento dos níveis de dopamina na via nigroestriatal, na diminuição dos efeitos adversos advindos do tratamento sintomático (tais como flutuações motoras e discinesias) e na atuação em outras neurotransmissões. A segunda abrange tratamentos visando diminuir ou interromper a neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos. A última se refere a tratamentos que promovam a substituição dos neurônios danificados por novas células, em especial pelo uso de implantes de células fetais ou pelo uso de fatores tróficos (Mandel et al., 2003, Youdim, 2010). No entanto, apenas o tratamento sintomático com agonistas dopaminérgicos é aprovado para a terapia da doença, além de fármacos coadjuvantes com ação de reduzir efeitos adversos ou aumentar a biodisponibilidade do fármaco base.

1.4.1- Tratamento atual clássico

A principal forma de tratamento da DP atualmente empregada tem como foco o reestabelecimento da neurotransmissão dopaminérgica nigroestriatal por meio da administração de LevoDOPA (L-DOPA), um precursor da síntese de DA, ou ainda pela administração de agonistas dopaminérgicos como bromocriptina e pramipexol. Apesar de ter sido introduzida há mais de 50 anos, a administração de L-DOPA se mantém a abordagem mais eficaz e mais utilizada no tratamento da DP (Hung e Schwarzschild, 2014).

Apesar de seu efeito benéfico na atividade motora, a L-DOPA apresenta certas limitações, já que clinicamente não demonstra capacidade de alterar o curso da doença e também não atua em sintomas não motores. Além disso, o uso prolongado de L-DOPA está associado a sérias alterações motoras, como as discinesias (movimentos involuntários), as flutuações motoras (diminuição gradual do efeito sintomático do tratamento) e o efeito “*on-off*” (períodos intercalados de efeito do medicamento e de perda desse efeito) (Hung e Schwarzschild, 2014). Discinesias são de grande importância clínica, já que apresentam incidência de 35-40% no período de 4 a 6 anos de início do

tratamento, chegando a 90% após uma década de tratamento (Ahlskog e Muentner, 2001). Agonistas dopaminérgicos também apresentam efeito antiparkinsoniano, tais como rotigotina, ropinirol e pramipexol, entretanto o uso destes está associado com uma série de efeitos colaterais tais como alucinações, náuseas e sonolência, além de desordens de controle de impulsos (Collins et al., 2015).

Portanto, há uma grande necessidade de abordagens alternativas no tratamento da DP, tanto para os sintomas motores como para não motores e de forma a evitar os efeitos adversos do tratamento com L-DOPA.

A L-DOPA é usualmente administrada com carbidopa ou benzerazida, ambos inibidores de descarboxilase de aminoácidos aromáticos, no intuito de diminuir a conversão periférica da L-DOPA, aumentando, assim, sua meia vida plasmática e sua biodisponibilidade cerebral (Stocchi, 2014). Inibidores da monoamina oxidase B (MAO-B) também podem ser associados ao tratamento com L-DOPA com o intuito de diminuir a degradação de DA cerebral (Meissner et al., 2011). As monoamina-oxidases intracitoplasmáticas são responsáveis pela degradação de neurotransmissores como a dopamina, sendo que os inibidores seletivos da MAO-B, como selegilina e rasagilina, são utilizados no tratamento da DP por aumentar a disponibilidade de DA no Sistema Nervoso Central (SNC).

A modulação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA também tem se mostrado clinicamente importante no manejo das discinesias, já que a amantadina, um antagonista NMDA não seletivo, representa o único tratamento aprovado para as discinesias induzidas por L-DOPA (Metman et al., 1998, Pahwa et al., 2006). Na DP, aumentos na atividade excitatória do glutamato pela via corticoestriatal podem incrementar a excitação da via indireta estriatopalidal, um efeito contrário ao desempenhado pela dopamina no estriado, que gera uma inibição por meio dos receptores D2 (Hirsch et al., 2000), contribuindo assim com o aumento dos sintomas motores da doença. Além disso, dado que receptores glutamatérgicos tem importante papel na plasticidade neural, distúrbios na neurotransmissão de glutamato também podem contribuir não só para os mecanismos geradores de sintomas, como também para as discinesias induzidas por L-DOPA (Calabresi et al., 2010, Jenner, 2008).

Novas perspectivas no tratamento da DP

Considerando-se as limitações apresentadas pelo tratamento farmacológico clássico atualmente empregado na DP, há grande interesse e esforço empenhados no desenvolvimento de novos fármacos capazes de agir em diferentes vias de neurotransmissão visando tratamentos sintomáticos com menores efeitos adversos. Mais ainda, vários estudos buscam abordagens que demonstrem clinicamente a atividade neuroprotetora e possam, assim, modificar o curso da DP, um avanço urgente e essencial dada a crescente importância dessa doença, a qual é incurável e está associada a uma série de custos econômicos e sociais para os pacientes e suas famílias.

1.4.2- Nova geração de fármacos envolvidos com diversos neurotransmissores

Antagonistas de Adenosina

Receptores de adenosina do tipo A2a estão associados a um efeito modulatório nos núcleos da base, sendo que a neurotransmissão de adenosina mediada por este receptor pode levar ao aumento na atividade GABAérgica pela via indireta do controle motor (Figura 1), em especial, por meio de um aumento da liberação de GABA pelo globo pálido (Schwarzschild et al., 2006, Jenner et al., 2009). Esse efeito se opõe ao da DA, que, em situações fisiológicas, inibe os neurônios GABAérgicos estriatopálidais pela ligação de DA a receptores D2. Assim, acredita-se que o bloqueio desses receptores para adenosina pode inibir a atividade excessiva na via indireta resultante da depleção de DA, como já foi demonstrado em modelos animais (Jenner, 2003). Evidências de que a cafeína, um antagonista não-seletivo de adenosina, apresenta ação antiparkinsoniana com melhora de funções motoras (Postuma et al., 2012) reforçam o potencial desses receptores no tratamento de sintomas da DP (Jenner et al., 2009, Schwarzschild, 2012).

O fármaco mais promissor até o momento que atua nesse alvo é a istradefilina (NOURIAST[®]), que é um antagonista A2a e teve seu efeito avaliado em testes clínicos para o tratamento da DP, sendo que, infelizmente, como monoterapia não demonstrou melhora nos sintomas da DP (Fernandez et al., 2010), e por isso teve sua solicitação de aprovação ao FDA (*Food and Drug Administration*) negada em 2008 (para revisão ver

Pinna, 2014). Entretanto, posteriormente foi demonstrado em diversos testes clínicos que, associada ao tratamento com L-DOPA, sua administração resultou em uma melhora de pacientes com flutuações motoras (LeWitt et al., 2008, Factor et al., 2010, Mizuno et al., 2013). Sendo assim, esse fármaco teve sua primeira aprovação no Japão para tratamento de flutuações na DP com uso concomitante ao de L-DOPA (Dungo e Deeks, 2013, Pinna, 2014). Efeitos similares também têm sido observados com os fármacos preladenant (Factor et al., 2013) e tozadenant (Olanow et al., 2013)

Fármacos que atuam na neurotransmissão GABAérgica

Os sintomas motores da DP também podem estar associados a uma desinibição do NST, como consequência da redução na neurotransmissão dopaminérgica. Assim, uma possível abordagem estudada consiste em promover o aumento da expressão da enzima ácido glutâmico descarboxilase (do inglês, GAD), com o intuito de favorecer a conversão de glutamato em GABA, o principal neurotransmissor inibitório do SNC (Luo et al., 2002), e por consequência aumentar a inibição no núcleo citado. Para tal, a transferência gênica do gene GAD no NST através de uma neurocirurgia já foi explorada em testes clínicos, demonstrando-se uma técnica segura e com efeitos sintomáticos positivos para os pacientes (Kaplitt et al., 2007, LeWitt et al., 2011).

Fármacos que atuam na neurotransmissão serotoninérgica

A neurotransmissão serotoninérgica está associada à modulação da atividade de diversos outros neurotransmissores, tais como GABA, glutamato e dopamina, sendo que na DP há evidências de uma neurodegeneração de neurônios serotoninérgicos nos núcleos da Rafe e, conseqüentemente, uma redução na neurotransmissão da serotonina (5-HT). Assim, há indícios de que a alteração na neurotransmissão serotoninérgica pode estar associada à indução tanto de sintomas motores como não motores da DP, assim como aos efeitos adversos do tratamento a longo prazo com L-DOPA (Huot et al., 2011). Em ratos, por exemplo, a administração do agonista serotoninérgico parcial de 5-HT_{1A} chamado piclozotan promoveu uma melhora nos distúrbios motores induzidos pelo tratamento repetitivo com L-DOPA (Tani et al., 2010).

1.4.3- Abordagens neuroprotetoras

Existe um grande interesse no desenvolvimento de terapias que modifiquem a progressão da DP, já que nela a degeneração de neurônios é progressiva, com consequente agravamento dos sintomas ao longo do tempo e diminuição da qualidade de vida dos pacientes. Para tanto, fármacos efetivamente neuroprotetores, que diminuam ou impeçam a progressão da doença, devem agir nas diversas vias patológicas de forma a amenizar ou impedir as manifestações tanto motoras quanto não motoras (Schapira et al., 2014). Para tanto, fármacos com ação anti-inflamatória, antioxidante, pró-mitocondrial ou removedoras de proteínas tóxicas representam potenciais ferramentas farmacológicas para tais tratamentos neuroprotetores.

Alteração mitocondrial

A mitocôndria é uma organela envolvida em diversos processos celulares, em especial a produção de energia na forma de ATP, o que a torna uma estrutura de grande importância para a homeostase metabólica e a sobrevivência celular, participando também da regulação de cálcio e da ativação de vias de morte celular (④- Figura 2). A importância da mitocôndria na patogênese da DP se tornou clara com a descoberta que o 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), um agente tóxico formado no processo de síntese da droga recreativa meperidina, induzia nos usuários uma síndrome de parkinsonismo responsivo a L-DOPA (Langston et al., 1983). O MPTP é capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica, sendo convertido pela microglia em MPP⁺, metabólito ativo que inibe o complexo I da cadeia de transporte de elétrons (CTE) mitocondrial (Mizuno et al., 1988). Também com os pesticidas Paraquat e Rotenona, ambos associados a um aumento no risco de DP, foi observada a capacidade de prejudicar a função mitocondrial e de aumentar a produção de ROS, com consequente morte de neurônios dopaminérgicos (Goldman, 2014). Além disso, estudos *post-mortem* mostram uma reduzida atividade do complexo I mitocondrial (Schapira et al., 1990) e pacientes com DP apresentam níveis plasmáticos elevados de marcadores para estresse oxidativo (Seet et al., 2010).

Uma primeira consequência do bloqueio do complexo I, responsável pela entrada dos elétrons na CTE, seria o estresse bioenergético e a diminuição da produção

de ATP. Em camundongos, o bloqueio do complexo I por MPP⁺, o metabólito ativo do MPTP, causa diminuição de aproximadamente 20% do ATP estriatal (Chan et al., 1991). Um efeito mais importante, porém, é a produção de ROS, tais como radicais superóxido e peróxido, que são subprodutos naturais da respiração mitocondrial. Em situações normais, os níveis de ROS são controlados por enzimas residentes na mitocôndria, tais como a superóxido dismutase e a glutatona oxidase. Entretanto, os níveis de ROS aumentam proporcionalmente ao bloqueio do complexo I, culminando na ativação de cascatas de morte celular, efeito observado com MPP⁺ e rotetona em ensaios in vitro (Perier et al., 2005). Níveis aumentados de ROS causam danos a praticamente todos os tipos de biomoléculas, podendo oxidar lipídeos, proteínas e DNA e, em última instância, levar à morte celular.

Mais ainda, duas proteínas codificadas por genes implicados na forma familiar da DP, Parkin e PINK1, também estão associados ao processo de renovação mitocondrial por mitofagia (autofagia mitocondrial), sendo que mutações nesses genes poderiam resultar em disfunção mitocondrial (Vincow et al., 2013) e por fim morte celular de neurônios dopaminérgicos.

Assim, tratamentos que regulam os processos de biogênese mitocondrial e degradação de mitocôndrias defeituosas apresentam potencial neuroprotetor (Tain et al., 2009). Nesse sentido, a proteína PGC-1 α , que é um coativador transcricional e promotor da biogênese mitocondrial, quando superexpressa, tem sido associada a uma proteção de neurônios dopaminérgicos. Esses dados são corroborados pelo efeito neuroprotetor do resveratrol, um ativador de PGC-1 α , quando administrado em ratos no modelo da DP induzido por 6-OHDA (Khan et al., 2010). O Peptídeo 1 semelhante a glucagon e o peptídeo Exendina-4 são outros compostos que também podem favorecer esse processo de biogênese mitocondrial, sendo que a administração da Exendina-4 em pacientes PD já se mostrou promissora em estudos clínicos (Aviles-Olmos et al., 2013).

Manejo de proteínas intracelulares

Considerando a importância do acúmulo de proteínas em diversas doenças neurodegenerativas, inclusive a DP, o manejo de proteínas aberrantes também parece

importante em abordagens neuroprotetoras. Esse acúmulo de proteínas pode estar associado tanto a um aumento de sua produção quanto a uma reduzida remoção das mesmas, sendo que defeitos de remoção estão associados ao comprometimento nos sistemas proteassomal ou lisossomal e estão associados à DP (Alvarez-Erviti et al., 2010). Sabe-se, por exemplo, que o acúmulo proteico de α -Sin (⑥- Figura 2), a principal proteína presente nos Corpos de Lewy (Spillantini et al., 1997), está intimamente associado à DP. Além disso, a duplicação e a triplicação do gene SNCA, mutações responsáveis por algumas formas familiares da doença, induzem uma crescente gravidade dos sintomas da DP de forma diretamente proporcional ao número de cópias do gene (Singleton et al., 2003, Ibáñez et al., 2004). Também se sabe que modificações pós traducionais nessa proteína, como fosforilações e ubiquitinação, podem estar associadas a agregação e toxicidade de α -Sin nos neurônios (Oueslati et al., 2010). A α -Sin também pode promover toxicidade neuronal por aumento no estresse oxidativo (Giasson et al., 2000) e inibição de sistemas proteassomais (Emmanouilidou et al., 2010). Além disso, essa proteína apresenta a capacidade de ser transferida entre neurônios (Kordower et al., 2008, Hansen et al., 2011), levando-se a crer que a patologia de α -Sin se espalha progressivamente na DP, levando a estágios cada vez mais avançados de degeneração em diferentes regiões cerebrais (Braak et al., 2003).

A proteína LRRK2 (⑦- Figura 2), uma quinase também associada à forma familiar (Healy et al., 2008), quando em sua forma mutada apresenta sua atividade quinase aumentada, resultando em autofosforilação, indicando também que inibidores de quinases podem ser uma importante via de tratamento (Deng et al., 2011). Já a enzima glucocerebrosidase é uma enzima lisossomal codificada pelo gene GBA e mutações neste gene representam um fator de risco para DP. Mutações em GBA levam a uma diminuição na atividade enzimática, o que está associado a um aumento nas concentrações de α -Sin, enquanto aumentos na concentração de α -Sin também podem levar também a reduções na atividade enzimática (Gegg, 2012; Schapira, 2013).

Por fim, abordagens que impeçam a formação de agregados proteicos ou que estimulem a degradação de formas mutadas de proteínas, através de mecanismos como degradação proteassomal ou mediada por chaperonas, assim como tratamentos que

impeçam a transmissão de formas tóxicas de α -Sin para neurônios saudáveis, apresentam grande potencial neuroprotetor (Auluck et al., 2002, Bové et al., 2011).

Paralelamente, a imunoterapia com anticorpos monoclonais também pode reduzir os níveis de oligômeros de proteínas. Em camundongos transgênicos superexpressando α -Sin, a imunização passiva com anticorpos monoclonais foi capaz de diminuir déficits motores e de aprendizagem, além de diminuir a aglomeração de α -Sin (Masliah et al., 2011). O uso de RNAi de forma a diminuir a expressão dessa proteína também representa uma abordagem recentemente estudada (Alvarez-Erviti et al., 2011, El-Andaloussi et al., 2012).

Neuroinflamação

No SNC, as células gliais (micróglia e astrócitos) apresentam múltiplas funções, em especial, elas são responsáveis pela resposta imune a diversos tipos de insultos. Sob estresse, a micróglia libera citocinas anti-inflamatórias e fatores neutróficos. Entretanto, em maior ou persistente estresse, há a liberação de citocinas pró-inflamatórias que recrutam células imunes e promovem a liberação de fatores tóxicos para a destruição do patógeno invasor. Portanto, ao mesmo tempo que a resposta neuroinflamatória é necessária para a eliminação de elementos nocivos ao sistema nervoso, uma resposta desregulada ou persistente pode se tornar deletéria.

Vários estudos relacionam a resposta neuroinflamatória com o desenvolvimento DP (①- Figura 2). A detecção de α -Sin pela micróglia, por exemplo, estimula a produção de ROS e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Zhang et al., 2005). Estudos em modelos animais demonstraram efeito benéfico no uso de fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais na progressão da DP, reforçando a ideia de que a doença e o processo neuroinflamatório estão interconectados (Ton et al., 2006).

Toxicidade do ferro

Outro agente associado ao desenvolvimento da DP é o excesso de ferro (③- Figura 2). Estudos *post-mortem* de cérebros de pacientes já mostraram uma quantidade aumentada de ferro e níveis baixos de ferritina (proteína de armazenamento de ferro)

nos núcleos da base, em especial na SN (Dexter et al., 1991). Também em pacientes vivos já foi demonstrado esse aumento, tanto na forma familiar da doença quanto na forma idiopática, sendo que, na forma idiopática, os níveis foram maiores que na primeira (Schweitzer et al., 2007). Um fator que pode estar associado à alta quantidade de ferro na SN é que a neuromelanina, pigmento encontrado em algumas populações de neurônios dopaminérgicos, inclusive os da SN, se liga com alta eficiência ao ferro, podendo assim contribuir para a suscetibilidade dessa estrutura na DP (Zecca et al., 2002).

O ferro tem sido implicado na patofisiologia da DP devido a sua capacidade de catalisar a produção de radicais hidroxil após reagir com superóxidos e peróxidos, subprodutos naturais do metabolismo celular, sendo que os radicais hidroxil são espécies de oxigênio altamente reativas e tóxicas (Sian-Hülsmann et al., 2011, Farina et al., 2013).

Em vista da importância do ferro na DP, o potencial neuroprotetor de quelantes de ferro tem sido avaliado. Tanto a administração do quelante deferiprone quanto de desferrioxamine, por exemplo, foram capazes de diminuir a degeneração neuronal no modelo de 6-OHDA (Dexter et al., 2011), sendo que deferiprone também se mostrou antiparkinsoniano no modelo de MPTP e foi recentemente submetido a um teste clínico piloto (Devos et al., 2014).

Toxicidade de cálcio

Como já citado, a característica de marca-passo dos neurônios dopaminérgicos da SN se baseia na presença e atividade de canais de cálcio $Ca_v1.3$ do tipo L, submetendo essas células a altos níveis citosólicos de cálcio. Entretanto, essa maior condutância ao íon cálcio está associada a um aumento de ROS mitocondrial e, conseqüentemente, à indução de estresse oxidativo. Além disso, essa atividade de marca-passo facilita a entrada de sódio e cálcio por receptores NMDA durante a excitação sináptica, induzindo excitotoxicidade e morte celular (②- Figura 2). Mais ainda, o aumento de cálcio intracelular pode induzir aumento nos níveis de dopamina no citosol, contribuindo dessa forma para a produção de ROS pela degradação desse neurotransmissor. Além

disso, um baixo nível, em neurônios dopaminérgicos, de proteínas que se ligam a cálcio pode contribuir para a suscetibilidade dos mesmos na SN (Guzman et al., 2010, Surmeier e Schumacker, 2013).

Sendo assim, fármacos como o Isradipine, que age bloqueando canais de cálcio $Ca_v1.3$ do tipo L (③- Figura 2), podem proteger os neurônios dopaminérgicos vulneráveis devido a sua atividade de controlar o influxo de cálcio, estando associados a um menor risco de desenvolver a DP (Becker et al., 2008, Ritz et al., 2010).

Mesmo com inúmeras pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos neuroprotetores para a DP, nenhum fármaco até o momento foi aprovado pelo FDA, sendo, portanto, um campo de grande interesse científico e tecnológico dada a importância da DP na sociedade.

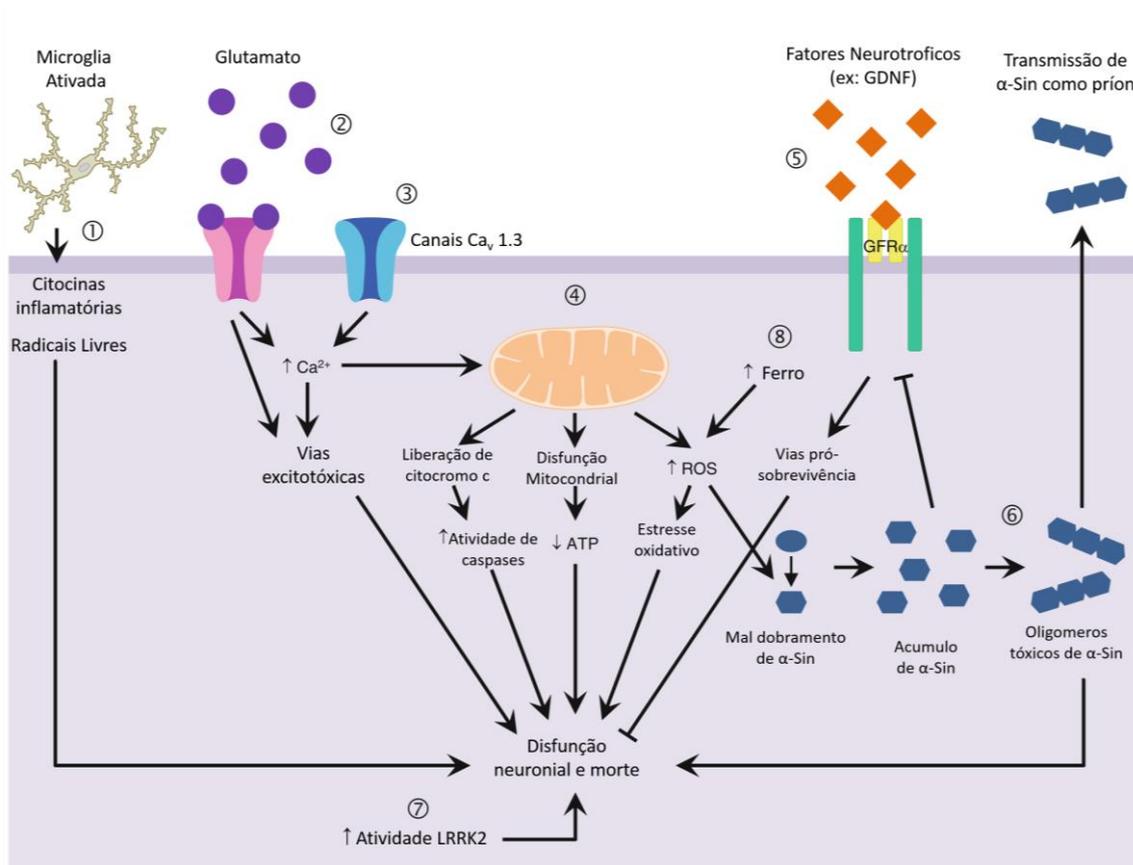


Figura 2. Representação das principais vias citotóxicas associadas à morte de neurônios dopaminérgicos na DP: **1)** Neuroinflamação **2)** Excitotoxicidade glutamatérgica **3)** Distúrbios na homeostase de cálcio **4)** Disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e apoptose **5)** Diminuição do aporte de fatores neutróficos **6)** Acúmulo de formas tóxicas da proteína α -Sin **7)** Aumento da atividade da quinase LRRK2 **8)** Distúrbios na homeostase de ferro. Adaptado de AlDakheel et al, 2014.

1.5- Neurovespina

A Neurovespina é um peptídeo sintético modificado a partir da Occidentalina-1202, uma neurotoxina de nove resíduos de aminoácidos isolada da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis*. A Occidentalina-1202, quando injetada por via intracerebroventricular (i.c.v) em ratos, apresentou um potente efeito antiepilético contra crises induzidas por convulsivantes químicos, além de aumentar a latência nos animais que apresentaram crise (Mortari, 2007). Como resultado das modificações estruturais, a Neurovespina se mostrou 6x mais potente que a Occidentalina-1202, com $DE_{50}=0,09\mu\text{g}$ por animal por via i.c.v e com efeito antiepilético dose-dependente, além de se mostrar capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. Em um estudo para avaliar o número de neurônios hiper-reativos após a indução de crise epilética, observou-se um efeito inibitório do tratamento com a Neurovespina, o que indica também um efeito neuroprotetor indireto, pois foi capaz de impedir a hiperexcitação e a morte de neurônios em decorrência da excitotoxicidade glutamatérgica (Anjos, 2013). Assim, esse peptídeo sintético representa um interessante alvo de estudos farmacológicos para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos como a DP.

Confidencial

Figura 3. Estrutura primária do peptídeo Neurovespina.

2. Justificativa

Considerando-se as constantes pressões seletivas nas interações entre predador e presa, as toxinas se tornaram importantes moléculas com grande potencial farmacológico, se mostrando altamente potentes e seletivas, agindo em especial no sistema nervoso (King, 2013). Nesse sentido, a peçonha de artrópodes se mostra como uma grande fonte de compostos potencialmente neuroativos, podendo apresentar efeitos analgésico, ansiolítico, antiepilético ou ainda neuroprotetor (Mortari e Cunha, 2013, Silva et al., 2015, Monge-Fuentes et al., 2015).

Nesse contexto, a peçonha de himenópteras apresenta uma série de compostos como peptídeos, enzimas e aminas biogênicas com múltiplas ações farmacológicas, sendo usada há anos na medicina tradicional chinesa para o tratamento de doenças como artrite e dor (Son et al., 2007). O uso da peçonha de *Apis mellifera* (apitoxina), associado à acupuntura, já se mostrou capaz de proteger neurônios da SN em camundongos lesados com a neurotoxina MPTP (Doo et al., 2010), além de induzir uma menor expressão de mediadores inflamatórios nesta região e de proteger os neurônios dopaminérgicos, quando injetada por via subcutânea (s.c.) (Kim et al., 2011). Mais ainda, ensaios *in vitro* mostraram a capacidade da apitoxina de proteger células de neuroblastoma humano contra MPP⁺, aumentando a viabilidade das células e agindo de forma anti-apoptótica (Doo et al., 2012).

Por fim, dado o potencial farmacológico das toxinas de artrópodes e o citado efeito neuroprotetor da peçonha de Hymenopteras, fica clara a importância de estudos que explorem o potencial destas substâncias naturais no desenvolvimento de fármacos que auxiliem no tratamento de doenças neurodegenerativas como no caso da DP. Dentro desse contexto, o peptídeo Neurovespina surge como uma destas substâncias, dado que, além de apresentar comprovada neuroatividade, é uma substância altamente eficaz e que não exibe efeitos tóxicos tanto em modelos agudos quanto em modelos crônicos de administração. A Neurovespina representa, portanto, um interessantíssimo alvo de estudos para o desenvolvimento de novos fármacos em modelos da DP.

3. Objetivos

3.1- Objetivo Geral

Considerando-se a ação neuroprotetora da Neurovespina previamente demonstrada no modelo de hiperexcitação glutamatérgica e a ausência de tratamentos que modifiquem a progressão da DP, este trabalho visou a avaliar a ação neuroprotetora desse peptídeo no modelo murino de Doença de Parkinson induzido por injeção de 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

3.2- Objetivos Específicos

Avaliar o efeito do peptídeo Neurovespina no desempenho motor no RotaRod de camundongos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.

Avaliar o efeito do peptídeo no desempenho sensitivo-motor (teste de remoção de fita adesiva) de camundongos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.

Avaliar o efeito antiparkinsoniano do tratamento com o peptídeo no teste de rotações induzidas por apomorfina (agonista dopaminérgico) após lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.

Quantificar a lesão nos animais por meio de contagem direta de neurônios dopaminérgicos da SN marcados por imunofluorescência.

Quantificar a lesão no estriado dos animais por meio de imunofluorescência e cálculo da Densidade Ótica com uso do programa ImageJ.

4. Materiais e Métodos

4.1- Bioensaios

Os bioensaios foram realizados em camundongos (*Mus musculus*) Swiss machos com 6 a 8 semanas de vida e com peso entre 25 e 35g. Os animais foram adquiridos do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UnB e acondicionados a temperatura (25°C) e umidade (55%) controladas e em ciclo de claro/escuro de 12/12 horas. Os animais foram garantidos de água filtrada e alimento *ad libitum* durante todo o período experimental.

Todos os procedimentos com animais foram executados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Lei Arouca (Lei 11.794/2008) e realizados somente mediante aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UnB) (UnBDOC nº 79100/2014, apêndice 1). Além disso, foi obtida a Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético (Processo nº 010476/2013-0, apêndice 2) com a finalidade de pesquisa científica.

4.1.1- Neurocirurgia

Para a indução de hemiparkinsonismo nos camundongos foi realizada uma cirurgia estereotáxica visando à infusão unilateral do composto neurotóxico 6-OHDA (Sigma-Aldrich®) no estriado. Os animais foram anestesiados utilizando-se Cetamina (Dopalen, Ceva®, 75mg/kg, via intraperitoneal (i.p.)) e Xilazina (Anasedan, Ceva® 15mg/kg, via i.p.) e em seguida posicionados em um estereotáxico (Insight Equipamentos®). Após assepsia com iodopovidona na região superior da cabeça dos animais, foi realizada uma injeção local de cloridrato de lidocaína com hemitartarato de norepinefrina (Lidostesim® 3%, Destsply Pharmaceutical®, via s.c.) seguida de exposição do crânio dos animais para realização das medições estereotáxicas. A região alvo do estriado foi estimada a partir do Bregma, nas coordenadas AP (anteroposterior): +0.4mm, ML (mesolateral): -1,8mm e DV (dorsoventral): -3.5mm de acordo com o Atlas Estereotáxico de Paxinos e Franklin (2001). Um furo, seguindo as coordenadas citadas,

foi feito para a implantação de uma agulha de 0,3mm de diâmetro acoplada a uma bomba de infusão, sendo feita assim a infusão da 6-OHDA (Sigma®) (4 μ l, 10 μ g base livre/ μ l em solução salina 0,9% e ácido ascórbico 0,2%) a uma taxa de 0,5 μ l por minuto. Após o termino da infusão, a agulha foi mantida no local por quatro minutos adicionais com o objetivo de permitir a difusão do composto sem extravasamentos. Previamente, foi testada também a metade da dose citada anteriormente (20 μ g/animal), porém esta não causou déficit motor considerável e, portanto, foi utilizada a dose descrita (40 μ g/animal), já em uso em nosso laboratório, capaz de causar a descoordenação motora e a morte neuronal nos animais.

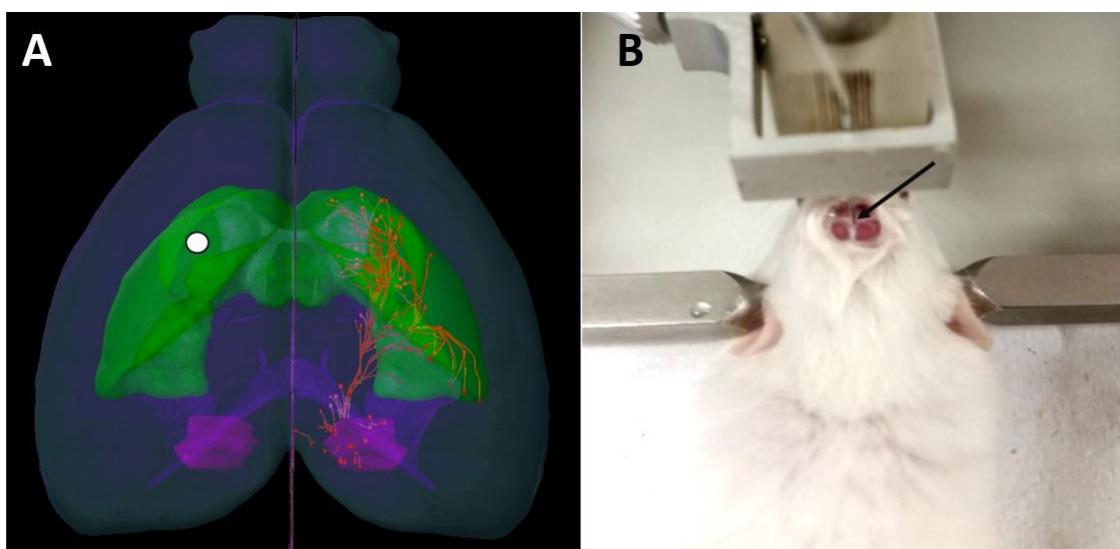


Figura 4. (A) Representação do local aproximado (círculo branco) de infusão do composto 6-OHDA por meio de cirurgia estereotáxica. Em verde a região do estriado, em rosa a Substância Negra e em laranja projeções unilaterais da SN para o estriado. À direita (B) cirurgia estereotáxica; seta representando alinhamento da agulha de infusão com o Bregma para realização das medidas estereotáxicas. Imagem à esquerda gerada no programa Brain Explorer-Allen Institute.

4.1.2- Cuidados pós-operatórios

Para evitar a mortalidade e diminuir a morbidez dos animais em decorrência do déficit motor causado pela cirurgia, foi seguido o seguinte protocolo de cuidados pós-operatórios (adaptado de Smith e Heuer, 2012). Nos quatro primeiros dias após a cirurgia, os animais receberam injeção de 200 μ l de soro fisiológico com 5% de glicose por via s.c. para evitar a desidratação dos animais. Além disso, os animais foram separados em 2-3 indivíduos por caixa para evitar agressividade e competição por

alimento. Por último, a ração foi macerada em água e disponibilizada aos animais em pequenos frascos dentro das caixas, facilitando a alimentação e evitando-se, assim, a desnutrição dos animais e perda excessiva de peso. Não foram administrados fármacos analgésicos ou anti-inflamatórios dado que estes poderiam alterar a atividade do peptídeo.

4.1.3- Protocolo experimental

Para a avaliação da atividade antiparkinsoniana do peptídeo, foi estabelecido um protocolo de 22 dias desde a lesão com 6-OHDA até o último dia de experimento, no qual os animais foram eutanasiados (Figura 5). Durante o período do experimento, foram realizados os seguintes procedimentos: tratamento dos animais com o peptídeo ou os devidos controles, avaliação do comprometimento motor no equipamento RotaRod, avaliação sensório-motora no teste de remoção de fita adesiva e teste de rotações induzidas por apomorfina. O dia da cirurgia foi intitulado D0, o dia 24h após a cirurgia foi intitulado D1 e assim sucessivamente.

Inicialmente foram testados dois regimes de tratamento. No regime Pré-Lesão a Neurovespina foi administrada via i.p. 30 minutos anteriormente à lesão e 24h e 48h após a lesão. No regime Pós-Lesão a Neurovespina foi administrada nos animais por via i.p. em três tempos- 24h, 48h e 72h após a lesão por 6-OHDA.

O regime Pós-Lesão foi aquele no qual o tratamento demonstrou melhor atividade e, sendo assim, o Pré-Lesão foi abandonado e foi dada continuidade aos experimentos utilizando-se o regime de tratamento com administrações do peptídeo nos tempos de 24h, 48h e 72h após a lesão por 6-OHDA. Sendo assim, os experimentos citados a partir deste ponto se referem ao regime Pós-Lesão.

Foram utilizados cinco grupos experimentais (Tabela 1), sendo eles: três grupos de tratamento, que tiveram a lesão induzida por 6-OHDA e receberam o peptídeo nas doses de 7, 4 e 1mg/kg de massa corporal do animal; um grupo teve a lesão e foi tratado somente com solução veículo (o mesmo veículo de diluição do peptídeo), também por via i.p, constituindo um controle negativo (chamado grupo Lesado); o último grupo foi submetido à cirurgia, porém, ao invés de 6-OHDA, recebeu infusão estriatal somente da

solução veículo (salina 0,9%, ácido ascórbico 0,2%) e tratamento com a solução veículo do peptídeo via i.p., representando um controle do modelo experimental (considerados grupo Sadio). Adicionalmente, foi utilizado um grupo para avaliar isoladamente a ação do peptídeo, na dose de 7mg/kg, em animais sadios, os quais não foram submetidos à cirurgia estereotáxica, sendo tratados e avaliados seguindo o mesmo protocolo que os demais grupos.

Tabela 1. *Compostos administrados por via intraestriatal ou por via intraperitoneal (tratamento) de acordo com cada grupo experimental.*

Grupo Experimental	Infusão Estriatal	Tratamento i.p.
<i>Controle Lesado</i>	6-OHDA	Salina 0,9%, DMSO 20%
<i>Tratamento- 7mg/kg</i>	6-OHDA	Neurovespina 7mg/kg
<i>Tratamento- 4mg/kg</i>	6-OHDA	Neurovespina 4mg/kg
<i>Tratamento- 1mg/kg</i>	6-OHDA	Neurovespina 1mg/kg
<i>Controle Sadio</i>	NaCl 0,9%, ac. ascórbico 0,2%	Salina 0,9%, DMSO 20%
<i>Controle Peptídeo</i>	Sem cirurgia	Neurovespina 7mg/kg

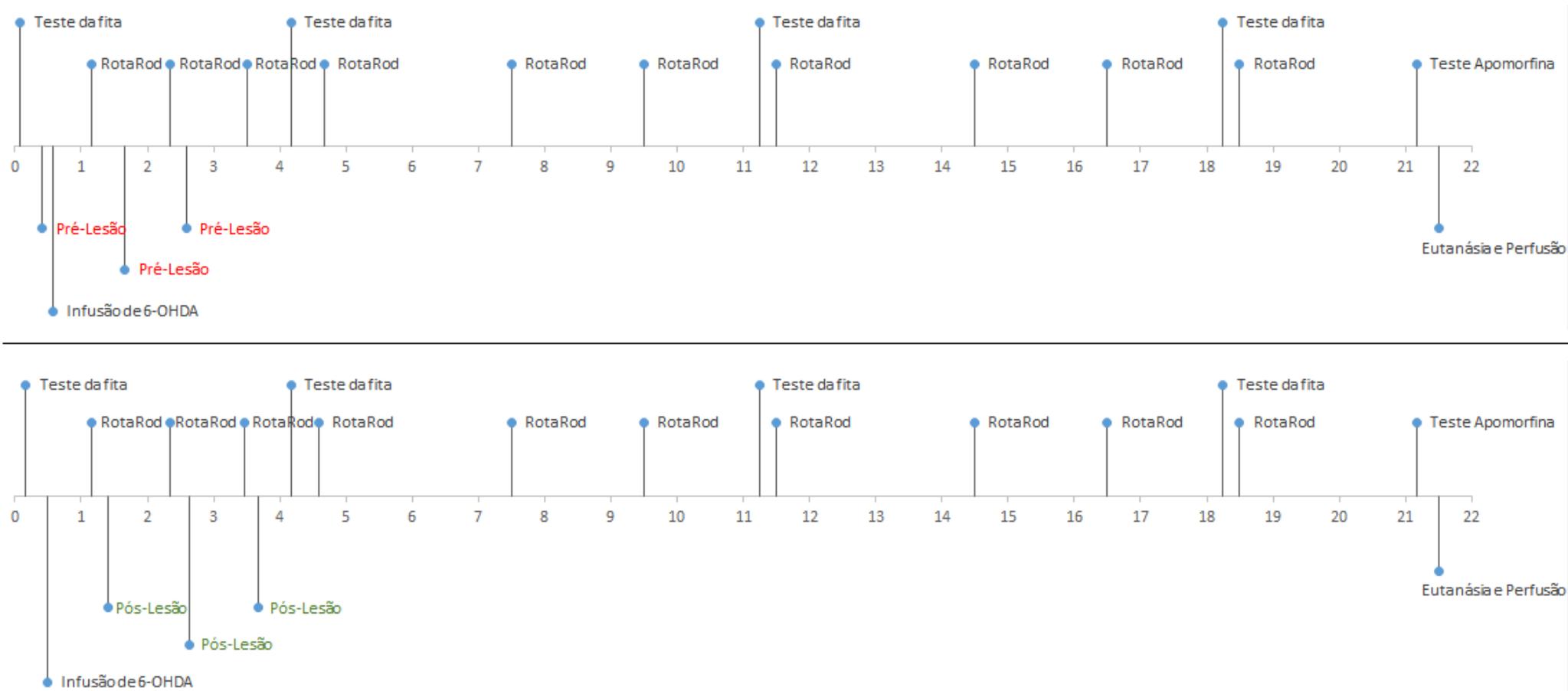


Figura 5. Linha temporal evidenciando o momento em que cada ensaio comportamental foi realizado e os dois regimes de tratamento primeiramente testados. Em vermelho e acima, o regime de Pré-Lesão, com os animais sendo tratados 30 minutos antes da lesão e 24 e 48 horas após a lesão. Em verde e abaixo, o Pós-Lesão, no qual os animais foram tratados 24, 48 e 72 horas após a lesão com 6-OHDA. Eixo horizontal representado os dias de cada evento (D0 a D21).

4.1.4- Preparo do peptídeo

O peptídeo Neurovespina foi sintetizado pela empresa Aminotech Desenvolvimento e Tecnologia Ltda (Brasil), com pureza e sequência atestadas tanto pela empresa contratada quanto pelo Laboratório de Neurofarmacologia da UnB, após sua entrega. Devido à sua lipossolubilidade e, por consequência, dificuldade de dissolução em água, o peptídeo foi solubilizado em solução salina 0,9% com 20% de DMSO e administrado a um volume de 500µl por animal.

4.1.5- Comprometimento Motor

Para a avaliação de alterações motoras após a lesão por 6-OHDA, foi utilizado o equipamento denominado RotaRod (Insight Equipamentos®, Brasil). Este equipamento consiste em um cilindro de 60mm de diâmetro com rotação a uma velocidade constante de 16rpm, no qual o animal deve se manter caminhando para permanecer no topo do cilindro, permitindo assim quantificar déficits na atividade motora em termos da latência de queda (tempo desde o posicionamento do animal no equipamento até sua eventual queda) após a lesão por 6-OHDA. Espera-se que animais sadios permaneçam mais tempo caminhando no aparelho que animais com descoordenação motora induzida pela infusão de 6-OHDA. Os animais foram treinados no aparelho RotaRod 24h antes do dia da lesão em cinco ciclos de cinco minutos de caminhada, com um intervalo de cinco minutos entre cada ciclo para descanso dos animais. No dia da cirurgia, foram submetidos à cirurgia somente os animais capazes de permanecer cinco minutos na barra giratória do RotaRod.

A latência de queda (usada como medida de descoordenação motora) consistiu na média de três medições diárias no RotaRod em intervalos de cinco minutos entre cada medição, sendo realizadas nos dias D1, D2, D3, D4, D7, D9, D11, D14, D16 e D18. Foi considerada como latência máxima a permanência de cinco minutos (300 segundos). Para animais que permaneceram por mais que esse tempo, a latência foi considerada como máxima e estes foram retirados do aparelho.

Buscando tanto uma maior homogeneidade nos grupos com lesão por 6-OHDA, quanto o estudo de animais com lesão mais grave, somente seguiram para o

experimento animais que, 24h depois da cirurgia (D1) e antes de receberem o primeiro tratamento, apresentaram uma latência média de queda menor do que 30 segundos.

4.1.6- Avaliação sensório-motora

Para a avaliação sensório-motora dos animais, foi realizado o teste de remoção de fita adesiva (adaptado de Bouet et al., 2009), que consistiu no posicionamento de uma tira de fita adesiva (0,8x0,8mm) na pata dianteira do animal no lado contralateral à lesão, sendo avaliado o tempo de remoção da fita (expresso em termos da latência de remoção) e permitindo-se, assim, observar déficits sensoriais (capacidade de percepção da fita) e motores (capacidade de remoção da fita). Espera-se que animais sadios percebam e retirem a fita adesiva em menor tempo que animais lesados.

Após a tira de fita ser colocada na pata contralateral dianteira, os animais foram posicionados em arena circular de acrílico e observados até a completa remoção da fita, sendo estabelecido o tempo máximo de dois minutos (120 segundos) para a remoção. No caso de animais que não foram capazes de retirar a fita dentro deste período, a fita foi retirada pelo experimentador e a latência foi considerada máxima. Os animais foram submetidos a este teste previamente à cirurgia (D0), como forma de estabelecer um tempo basal antes da lesão, e nos dias D4, D11 e D18 após a cirurgia.

4.1.7- Rotações induzidas por apomorfina

No último dia de experimento (D21) foi feito o teste de rotações induzidas por apomorfina, um agonista dopaminérgico direto que, em animais com lesão estriatal unilateral, induz rotações contralaterais involuntárias em quantidades proporcionais ao grau de lesão. Foi injetada uma dose de apomorfina de 0,5mg/kg de animal em solução salina (0,9% NaCl) por via s.c. e os animais foram imediatamente colocados em uma arena de acrílico, sendo o comportamento rotatório gravado por 15 minutos. O total de rotações foi posteriormente contabilizado por contagem manual e as rotações foram expressas em termos de rotações por minuto.

4.2- Avaliação Imunoistoquímica

Ao fim dos ensaios comportamentais, após o teste de rotações induzidas por apomorfina, os animais foram eutanasiados com tiopental sódico (Thiopentax, Cristália®; 60mg/kg de animal) e perfundidos por via transcardial com solução salina 0,9% e em seguida com formaldeído 4%. Em seguida, os cérebros dos animais foram retirados com auxílio de tesoura e pinça e colocados em solução de formaldeído 4% por pelo menos 24h. Após o período de fixação, os cérebros foram colocados em solução de sacarose 30% por 48h e em seguida foram feitos cortes coronais de 40µm de espessura em micrótomo de vibração (KEDEE® KD-400). Foram selecionados cortes da região da Substância Negra (-3,64 a -3,16 mm em relação ao Bregma) e do estriado (0,26 a 0,50 mm em relação ao Bregma). Cortes adicionais do local de inserção na agulha para infusão de 6-OHDA também foram coletados para aferir o correto posicionamento da mesma durante a cirurgia. Os cortes foram estocados em solução anti-congelamento (30% glicerina e 30% etilenoglicol) a 4°C até o uso.

Para a avaliação dos neurônios presentes na SN, foi realizada imunomarcção anti-tirosina hidroxilase (TH), uma enzima necessária para a produção de catecolaminas que está presente nos neurônios dopaminérgicos. Foram selecionados três cortes da Substância Negra e três do Estriado para cada animal. Primeiramente, os cortes foram retirados da solução anti-congelamento e lavados duas vezes com tampão fosfato-salina (*Phosphate Buffered Saline* - PBS; NaCl 137mM, KCl 2,7mM, NaHPO₄2H₂O 10mM, KH₂PO₄ 2mM) por dez minutos em agitação constante. Em seguida, os cortes foram incubados por uma hora com PBS contendo 0,8% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich®) para permeabilização das células. Ao fim do processo os cortes foram lavados com PBS cinco vezes por cinco minutos em agitação e, em seguida, incubados com solução para o bloqueio de proteínas inespecíficas (*protein block*, 1% BSA, 10% leite desnatado, 0,3M de glicina e 0,1% tween 20) por mais uma hora. Foram novamente lavados por três vezes com PBS por dez minutos e em seguida incubados com o anticorpo primário (ab112; abcam®)(1:1000) por 48h a 4°C em agitação. Ao fim das 48h os cortes foram novamente lavados com PBS por 3 vezes durante 10 minutos em agitação e incubados com o anticorpo secundário fluorescente (ab150077; abcam®)(1:400) em agitação, à temperatura ambiente e abrigados da luz por três horas. Depois, foram lavados com PBS

por três vezes durante quatro minutos, também no escuro, e fixados em lâminas de microscopia utilizando-se meio de montagem com o corante DAPI para ácidos nucleicos (*Fluoroshield Mounting Medium With DAPI*; abcam®), para posterior análise em microscópio.

Para a análise das lâminas foi utilizado microscópio de epifluorescência (Leica® DM2000) acoplado a câmera (Leica® DFC310 FX), com filtros de excitação BP 480/40 (visualizado como verde; marcação anti-TH) e BP 340-380 (visualizado como azul; marcação para núcleos celulares). Os neurônios reativos à marcação anti-TH (THr) foram contados manualmente com auxílio do programa ImageJ 1.48v (National Institute of Health- NIH) a partir de fotos coletadas com aumento de 200x, sendo avaliados tanto os neurônios da Substância Negra quanto os da região dopaminérgica anexa chamada Área Tegumentar Ventral (do inglês, VTA). O lado contralateral à lesão (considerado lado sadio) foi utilizado como controle interno para a lado ipsilateral (local da lesão; lado lesado), calculando-se, assim, a porcentagem de neurônios THr remanescentes pela seguinte fórmula:

$$\frac{\text{quantidade de neurônios do lado ipsilateral}}{\text{quantidade de neurônios do lado contralateral}} * 100$$

Para a contagem de neurônios THr, apenas foram considerados neurônios com citoplasma bem definido, integro e com boa coloração, além de possuir contorno da região nuclear também bem definido, tal como exemplificado na Figura 6:

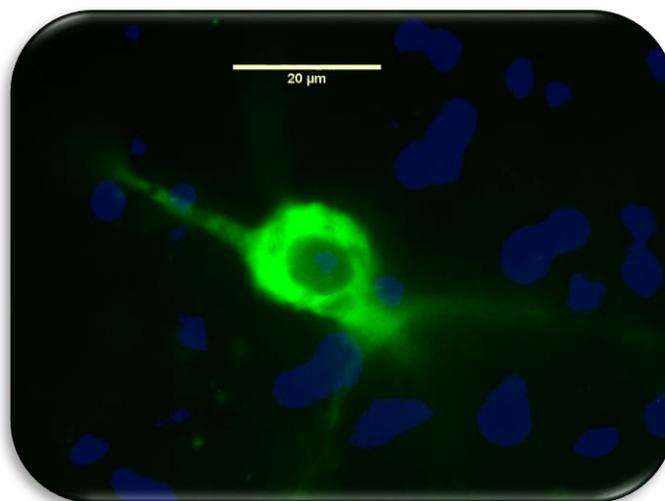


Figura 6. Exemplo de um neurônio THr, em aumento de 1000x, considerado viável para contagem de células. Em verde marcação anti-TH e em azul coloração DAPI. Barra de escala de 20μm.

Para a análise do estriado, foram capturadas imagens dessa região em aumento de 40x e selecionadas regiões de interesse (RI), sendo em seguida medido o valor médio de cinza (VC) utilizando o programa ImageJ 1.48v (NIH). Foi feito um cálculo de Densidade Ótica (DO) seguindo a seguinte fórmula (Palha et al, 2002; Sesito et al, 2011):

$$DO = \log_{10} \left[\frac{255}{255 - (VC_{RI} - VC_{fundo})} \right]$$

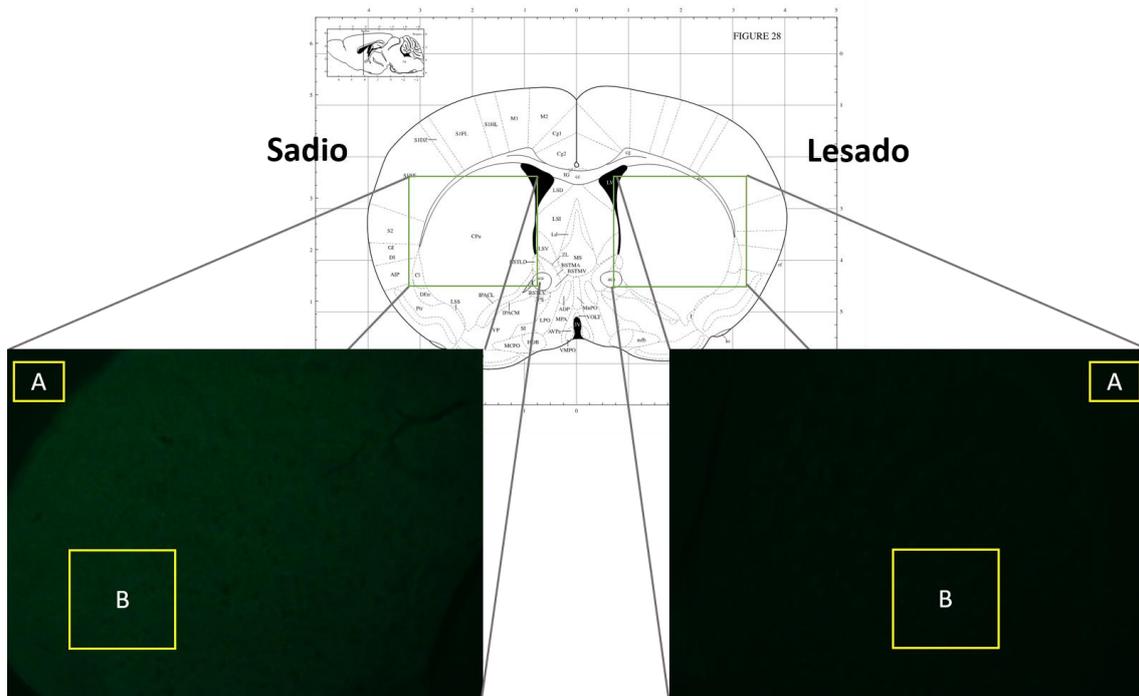


Figura 7. Demonstração de imunomarcção anti-TH na região do estriado, mostrando à esquerda o lado contralateral sadio e à direita o lado ipsilateral lesado. Destaque em A para a região de fundo considerada para as análises de Densidade Ótica e em B a Região de Interesse.

4.3- Análises Estatísticas

Para o cálculo do tamanho amostral, foi usada de base a seguinte fórmula, indicada pelo CEUA-UnB:

$$n = 1 + \left[2C \times \left(\frac{s}{d} \right)^2 \right]$$

Na qual:

s: desvio padrão

d: diferença esperada entre os grupos

$$C = (z\alpha + z\beta)^2$$

α : grau de significância

$1-\beta$: poder do teste

Foram adotados, para o cálculo, valores de $\alpha=0,05$ e poder de teste de 90%, resultando em um valor de

$$C = (1,96 + 1,282)^2 = 10,51.$$

Considerando-se também um desvio máximo de 0,2 e uma diferença projetada de 0,5, tem-se que:

$$n = 1 + \left[2 \times 10,51 \times \left(\frac{0,2}{0,5} \right)^2 \right] = 4,36$$

Ou seja, tem-se uma previsão de $n=5$ (inteiro mais próximo) como tamanho mínimo para cada grupo amostral. Entretanto, vale ressaltar que variações interindividuais de comportamento podem refletir em maior variabilidade nos resultados, sendo que um tamanho amostral maior permite um aumento da representatividade dos grupos em relação à população. Assim sendo, foi estipulado um tamanho amostral de $n=6-8$ de forma a trazer mais acurácia aos resultados.

Tanto para a análise estatística de comprometimento motor (RotaRod) quanto para a de comprometimento sensório-motor (remoção de fita adesiva) nos diferentes dias, foi realizada análise de variância (ANOVA) design misto de medidas repetidas seguida do pós-teste de Dunnett comparando os grupos com o controle Lesado. De forma a comparar o efeito dos tratamentos no experimento como um todo, também foi calculada a Área Sob Curva (ASC), tanto para o RotaRod quanto para o teste de remoção de fita, seguindo de ANOVA e pós-teste de Dunnett e Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, respectivamente.

No caso das rotações induzidas por apomorfina foi realizado o teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Foi comparada a quantidade de neurônios THr da

SN e da VTA entre o lado ipsilateral e o lado contralateral dentro de cada grupo por meio do teste Mann-Whitney; no caso da DO do estriado foi utilizado o teste t-Student. Já a porcentagem de neurônios THr remanescentes e porcentagem de DO foram analisados por meio do teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn.

Foi considerado $p < 0,05$ como significância. Todos os gráficos foram expressos em termos da média e do erro padrão da média (EPM), tendo sido as análises estatísticas e os gráficos feitos com auxílio do programa GraphPad Prism 6.04 (La Jolla California USA).

5. Resultados

Confidencial

Confidencial

Confidencial

8. Referências Bibliográficas

- AARSLAND, D., BEYER, M. K. & KURZ, M. W. 2008. Dementia in Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology*, 21, 676-682.
- AGID, Y. 1991. Parkinson's disease: pathophysiology. *The Lancet*, 337, 1321-1324.
- AHLSSKOG, J. E. & MUENTER, M. D. 2001. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Movement Disorders*, 16, 448-458.
- ALDAKHEEL, A., KALIA, L. V. & LANG, A. E. 2013. Pathogenesis-Targeted, Disease-Modifying Therapies in Parkinson Disease. *Neurotherapeutics*, 11, 6-23.
- ALVAREZ-ERVITI, L., RODRIGUEZ-OROZ, M. C., COOPER, J. & ET AL. 2010. Chaperone-mediated autophagy markers in parkinson disease brains. *Archives of Neurology*, 67, 1464-1472.
- ALVAREZ-ERVITI, L., SEOW, Y., YIN, H., BETTS, C., LAKHAL, S. & WOOD, M. J. A. 2011. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotech*, 29, 341-345.
- AULUCK, P. K., CHAN, H. Y. E., TROJANOWSKI, J. Q., LEE, V. M.-Y. & BONINI, N. M. 2002. Chaperone Suppression of α -Synuclein Toxicity in a Drosophila Model for Parkinson's Disease. *Science*, 295, 865-868.
- AVILES-OLMOS, I., DICKSON, J., KEFALOPOULOU, Z., DJAMSHIDIAN, A., ELL, P., SODERLUND, T., WHITTON, P., WYSE, R., ISAACS, T., LEES, A., LIMOUSIN, P. & FOLTYNIE, T. 2013. Exenatide and the treatment of patients with Parkinson's disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 123, 2730-2736.
- BECKER, C., JICK, S. S. & MEIER, C. R. 2008. Use of antihypertensives and the risk of Parkinson disease. *Neurology*, 70, 1438-1444.
- BEN-SHACHAR, D., RIEDERER, P. & YODIM, M. B. H. 1991. Iron-Melanin Interaction and Lipid Peroxidation: Implications for Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry*, 57, 1609-1614.
- BERTILSSON, G., PATRONE, C., ZACHRISSON, O., ANDERSSON, A., DANNAEUS, K., HEIDRICH, J., KORTESMAA, J., MERCER, A., NIELSEN, E., RÖNNHOLM, H. & WIKSTRÖM, L. 2008. Peptide hormone exendin-4 stimulates subventricular zone neurogenesis in the adult rodent brain and induces recovery in an animal model of parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Research*, 86, 326-338.
- BJÖRKLUND, A., DUNNETT, S. B., STENEVI, U., LEWIS, M. E. & IVERSEN, S. D. 1980. Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: Functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing. *Brain Research*, 199, 307-333.
- BOUET, V., BOULOUARD, M., TOUTAIN, J., DIVOUX, D., BERNAUDIN, M., SCHUMANN-BARD, P. & FRERET, T. 2009. The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. *Nat. Protocols*, 4, 1560-1564.
- BOVÉ, J., MARTÍNEZ-VICENTE, M. & VILA, M. 2011. Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. *Nat Rev Neurosci*, 12, 437-452.
- BRAAK, H., TREDICI, K. D., RÜB, U., DE VOS, R. A. I., JANSEN STEUR, E. N. H. & BRAAK, E. 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 24, 197-211.

- CALABRESI, P., FILIPPO, M. D., GHIGLIERI, V., TAMBASCO, N. & PICCONI, B. 2010. Levodopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease: filling the bench-to bedside gap. *The Lancet Neurology*, 9, 1106-1117.
- CARNEIRO, L. A. 2013. Avaliação da atividade antiepiléptica e da expressão neuronal de c-fos de dois peptídeos sintetizados a partir da Occidentalina-1202 isolada da vespa social *Polybia occidentalis*. 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal)—Universidade de Brasília, Brasília.
- CHAN, P., DELANNEY, L. E., IRWIN, I., LANGSTON, J. W. & DI MONTE, D. 1991. Rapid ATP Loss Caused by 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine in Mouse Brain. *Journal of Neurochemistry*, 57, 348-351.
- CHAUDHURI, K. R. & SCHAPIRA, A. H. V. 2009. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *The Lancet Neurology*, 8, 464-474.
- CICCHETTI, F., BROWNELL, A. L., WILLIAMS, K., CHEN, Y. I., LIVNI, E. & ISACSON, O. 2002. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *European Journal of Neuroscience*, 15, 991-998.
- COLLINS, L., CUMMINS, G. & BARKER, R. A. 2015. Parkinson's disease: diagnosis and current management. *Prescriber*, 26, 16-23.
- DAMIER, P., HIRSCH, E. C., AGID, Y. & GRAYBIEL, A. M. 1999. *The substantia nigra of the human brain*.
- DE LAU, L. M. L. & BRETELER, M. M. B. 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 5, 525-535.
- DENG, X., DZAMKO, N., PRESCOTT, A., DAVIES, P., LIU, Q., YANG, Q., LEE, J.-D., PATRICELLI, M. P., NOMANBHOY, T. K., ALESSI, D. R. & GRAY, N. S. 2011. Characterization of a selective inhibitor of the Parkinson's disease kinase LRRK2. *Nat Chem Biol*, 7, 203-205.
- DEVOS, D., MOREAU, C., DEVEDJIAN, J. C., KLUZA, J., PETRAULT, M., LALOUX, C., JONNEAUX, A., RYCKEWAERT, G., GARÇON, G., ROUAIX, N., DUHAMEL, A., JISSENDI, P., DUJARDIN, K., AUGER, F., RAVASI, L., HOPES, L., GROLEZ, G., FIRDAUS, W., SABLONNIÈRE, B., STRUBI-VUILLAUME, I., ZAHN, N., DESTÉE, A., CORVOL, J.-C., PÖLTL, D., LEIST, M., ROSE, C., DEFEBVRE, L., MARCHETTI, P., CABANTCHIK, Z. I. & BORDET, R. 2014. Targeting Chelatable Iron as a Therapeutic Modality in Parkinson's Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21, 195-210.
- DEXTER, D., STATTON, S., WHITMORE, C., FREINBICHLER, W., WEINBERGER, P., TIPTON, K., DELLA CORTE, L., WARD, R. & CRICHTON, R. 2011. Clinically available iron chelators induce neuroprotection in the 6-OHDA model of Parkinson's disease after peripheral administration. *Journal of Neural Transmission*, 118, 223-231.
- DEXTER, D. T., CARAYON, A., JAVOY-AGID, F., AGID, Y., WELLS, F. R., DANIEL, S. E., LEES, A. J., JENNER, P. & MARSDEN, C. D. 1991. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Oxford Univ Press*, 114, 1953-1975.
- DILIP, A. P., VISHAL, A. P., SANJAY, B. B., SANJAY, J. S. & PRAVIN, O. P. 2014. Animal Models for Parkinson's Disease. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 13, 1580-1594.
- DOO, A.-R., KIM, S.-N., KIM, S.-T., PARK, J.-Y., CHUNG, S.-H., CHOE, B.-Y., CHAE, Y., LEE, H., YIN, C.-S. & PARK, H.-J. 2012. Bee venom protects SH-SY5Y human

- neuroblastoma cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic cell death. *Brain Research*, 1429, 106-115.
- DOO, A.-R., KIM, S.-T., KIM, S.-N., MOON, W., YIN, C. S., CHAE, Y., PARK, H.-K., LEE, H. & PARK, H.-J. 2010. 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*, 32, 88-91.
- DORSEY, E. R., CONSTANTINESCU, R., THOMPSON, J. P., BIGLAN, K. M., HOLLOWAY, R. G., KIEBURTZ, K., MARSHALL, F. J., RAVINA, B. M., SCHIFFITTO, G., SIDEROWF, A. & TANNER, C. M. 2007. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*, 68, 384-386.
- DUNGO, R. & DEEKS, E. 2013. Istradefylline: First Global Approval. *Drugs*, 73, 875-882.
- EL-ANDALOUSSI, S., LEE, Y., LAKHAL-LITTLETON, S., LI, J., SEOW, Y., GARDINER, C., ALVAREZ-ERVITI, L., SARGENT, I. L. & WOOD, M. J. A. 2012. Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. *Nat. Protocols*, 7, 2112-2126.
- EMMANOUILIDOU, E., STEFANIS, L. & VEKRELLIS, K. 2010. Cell-produced α -synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. *Neurobiology of Aging*, 31, 953-968.
- FACTOR, S., MARK, M. H., WATTS, R., STRUCK, L., MORI, A., BALLERINI, R. & SUSSMAN, N. M. 2010. A long-term study of istradefylline in subjects with fluctuating Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 16, 423-426.
- FACTOR, S. A., WOLSKI, K., TOGASAKI, D. M., HUYCK, S., CANTILLON, M., HO, T. W., HAUSER, R. A. & POURCHER, E. 2013. Long-term safety and efficacy of pramipexole in subjects with fluctuating Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 28, 817-820.
- FARINA, M., AVILA, D. S., DA ROCHA, J. B. T. & ASCHNER, M. 2013. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on iron, manganese and mercury. *Neurochemistry International*, 62, 575-594.
- FERNANDEZ, H. H., GREELEY, D. R., ZWEIG, R. M., WOJCIESZEK, J., MORI, A. & SUSSMAN, N. M. 2010. Istradefylline as monotherapy for Parkinson disease: Results of the 6002-US-051 trial. *Parkinsonism & Related Disorders*, 16, 16-20.
- FOLTYNIE, T. & AVILES-OLMOS, I. Exenatide as a potential treatment for patients with Parkinson's disease: First steps into the clinic. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 10, S38-S46.
- GIASSON, B. I., DUDA, J. E., MURRAY, I. V. J., CHEN, Q., SOUZA, J. M., HURTIG, H. I., ISCHIROPOULOS, H., TROJANOWSKI, J. Q. & -Y. LEE, V. M. 2000. Oxidative Damage Linked to Neurodegeneration by Selective α -Synuclein Nitration in Synucleinopathy Lesions. *Science*, 290, 985-989.
- GOLDMAN, S. M. 2014. Environmental Toxins and Parkinson's Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 54, 141-164.
- GUZMAN, J. N., SANCHEZ-PADILLA, J., WOKOSIN, D., KONDAPALLI, J., ILIJIC, E., SCHUMACKER, P. T. & SURMEIER, D. J. 2010. Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature*, 468, 696-700.
- HANSEN, C., ANGOT, E., BERGSTR, XF, M, A.-L., STEINER, J. A., PIERI, L., PAUL, G., OUTEIRO, T. F., MELKI, R., KALLUNKI, P., FOG, K., LI, J.-Y. & BRUNDIN, P. 2011. α -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and

- seeds aggregation in cultured human cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 121, 715-725.
- HAWKES, C. H. 2008. Parkinson's disease and aging: Same or different process? *Movement Disorders*, 23, 47-53.
- HEALY, D. G., FALCHI, M., O'SULLIVAN, S. S., BONIFATI, V., DURR, A., BRESSMAN, S., BRICE, A., AASLY, J., ZABETIAN, C. P., GOLDWURM, S., FERREIRA, J. J., TOLOSA, E., KAY, D. M., KLEIN, C., WILLIAMS, D. R., MARRAS, C., LANG, A. E., WSZOLEK, Z. K., BERCIANO, J., SCHAPIRA, A. H. V., LYNCH, T., BHATIA, K. P., GASSER, T., LEES, A. J. & WOOD, N. W. 2008. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *The Lancet Neurology*, 7, 583-590.
- HENDERSON, J. M., WATSON, S., HALLIDAY, G. M., HEINEMANN, T. & GERLACH, M. 2003. Relationships between various behavioural abnormalities and nigrostriatal dopamine depletion in the unilateral 6-OHDA-lesioned rat. *Behavioural Brain Research*, 139, 105-113.
- HILKER, R., SCHWEITZER, K., COBURGER, S. & ET AL. 2005. Nonlinear progression of parkinson disease as determined by serial positron emission tomographic imaging of striatal fluorodopa f 18 activity. *Archives of Neurology*, 62, 378-382.
- HIRSCH, E. C., PÉRIER, C., ORIEUX, G., FRANÇOIS, C., FÉGER, J., OME YELNIK, J., VILA, M., LEVY, R., TOLOSA, E. S., MARIN, C., HERRERO, M. T., OBESO, J. A. & AGID, Y. 2000. Metabolic effects of nigrostriatal denervation in basal ganglia. *Trends in Neurosciences*, 23, Supplement 1, S78-S85.
- HUDSON, J. L., VAN HORNE, C. G., STRÖMBERG, I., BROCK, S., CLAYTON, J., MASSERANO, J., HOFFER, B. J. & GERHARDT, G. A. 1993. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Research*, 626, 167-174.
- HUNG, A. & SCHWARZSCHILD, M. 2014. Treatment of Parkinson's Disease: What's in the Non-dopaminergic Pipeline? *Neurotherapeutics*, 11, 34-46.
- HUOT, P., FOX, S. H. & BROTCHE, J. M. 2011. The serotonergic system in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 95, 163-212.
- IANCU, R., MOHAPEL, P., BRUNDIN, P. & PAUL, G. 2005. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behavioural Brain Research*, 162, 1-10.
- IBÁÑEZ, P., BONNET, A. M., DÉBARGES, B., LOHMANN, E., TISON, F., AGID, Y., DÜRR, A., BRICE, A. & POLLAK, P. 2004. Causal relation between α -synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *The Lancet*, 364, 1169-1171.
- JANKOVIC, J. 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 79, 368-376.
- JENNER, P. 2003. A2A antagonists as novel non-dopaminergic therapy for motor dysfunction in PD. *Neurology*, 61, S32-S38.
- JENNER, P. 2008. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Rev Neurosci*, 9, 665-677.
- JENNER, P., MORI, A., HAUSER, R., MORELLI, M., FREDHOLM, B. B. & CHEN, J. F. 2009. Adenosine, adenosine A2A antagonists, and Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 15, 406-413.

- KAPLITT, M. G., FEIGIN, A., TANG, C., FITZSIMONS, H. L., MATTIS, P., LAWLOR, P. A., BLAND, R. J., YOUNG, D., STRYBING, K., EIDELBERG, D. & DURING, M. J. 2007. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *The Lancet*, 369, 2097-2105.
- KHAN, M. M., AHMAD, A., ISHRAT, T., KHAN, M. B., HODA, M. N., KHUWAJA, G., RAZA, S. S., KHAN, A., JAVED, H., VAIBHAV, K. & ISLAM, F. 2010. Resveratrol attenuates 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage and dopamine depletion in rat model of Parkinson's disease. *Brain Research*, 1328, 139-151.
- KIM, J.-I., YANG, E. J., LEE, M. S., KIM, Y.-S., HUH, Y., CHO, I.-H., KANG, S. & KOH, H.-K. 2011. Bee Venom Reduces Neuroinflammation in the MPTP-Induced Model of Parkinson's Disease. *International Journal of Neuroscience*, 121, 209-217.
- KING, G. 2013. Venoms to drugs: translating venom peptides into therapeutics. *Australian Biochemist*, 44.
- KIRIK, D., ROSENBLAD, C. & BJÖRKLUND, A. 1998. Characterization of Behavioral and Neurodegenerative Changes Following Partial Lesions of the Nigrostriatal Dopamine System Induced by Intrastratial 6-Hydroxydopamine in the Rat. *Experimental Neurology*, 152, 259-277.
- KIRIK, D., ROSENBLAD, C. & BJÖRKLUND, A. 2000. Preservation of a functional nigrostriatal dopamine pathway by GDNF in the intrastratial 6-OHDA lesion model depends on the site of administration of the trophic factor. *European Journal of Neuroscience*, 12, 3871-3882.
- KOOB, G. F. & VOLKOW, N. D. 2009. Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35, 217-238.
- KORDOWER, J. H., CHU, Y., HAUSER, R. A., FREEMAN, T. B. & OLANOW, C. W. 2008. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med*, 14, 504-506.
- KUMARI, U. & TAN, E. K. 2009. LRRK2 in Parkinson's disease: genetic and clinical studies from patients. *FEBS Journal*, 276, 6455-6463.
- LANGSTON, J., BALLARD, P., TETRUD, J. & IRWIN, I. 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219, 979-980.
- LE, W., SAYANA, P. & JANKOVIC, J. 2013. Animal Models of Parkinson's Disease: A Gateway to Therapeutics? *Neurotherapeutics*, 11, 92-110.
- LESAGE, S. & BRICE, A. 2009. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Human Molecular Genetics*, 18, R48-R59.
- LEVY, G., TANG, M.-X., LOUIS, E., COTE, L., ALFARO, B., MEJIA, H., STERN, Y. & MARDER, K. 2002. The association of incident dementia with mortality in PD. *Neurology*, 59, 1708-1713.
- LEWITT, P. A., GUTTMAN, M., TETRUD, J. W., TUIITE, P. J., MORI, A., CHAIKIN, P. & SUSSMAN, N. M. 2008. Adenosine A2A receptor antagonist istradefylline (KW-6002) reduces "off" time in Parkinson's disease: A double-blind, randomized, multicenter clinical trial (6002-US-005). *Annals of Neurology*, 63, 295-302.
- LEWITT, P. A., REZAI, A. R., LEEHEY, M. A., OJEMANN, S. G., FLAHERTY, A. W., ESKANDAR, E. N., KOSTYK, S. K., THOMAS, K., SARKAR, A., SIDDIQUI, M. S., TATTER, S. B., SCHWALB, J. M., POSTON, K. L., HENDERSON, J. M., KURLAN, R. M., RICHARD, I. H., VAN METER, L., SAPAN, C. V., DURING, M. J., KAPLITT, M. G. & FEIGIN, A. 2011.

- AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *The Lancet Neurology*, 10, 309-319.
- LUO, J., KAPLITT, M. G., FITZSIMONS, H. L., ZUZGA, D. S., LIU, Y., OSHINSKY, M. L. & DURING, M. J. 2002. Subthalamic GAD Gene Therapy in a Parkinson's Disease Rat Model. *Science*, 298, 425-429.
- MANDEL, S., GRÜNBLATT, E., RIEDERER, P., GERLACH, M., LEVITES, Y. & YODIM, M. H. 2003. Neuroprotective Strategies in Parkinson's Disease. *CNS Drugs*, 17, 729-762.
- MASLIAH, E., ROCKENSTEIN, E., MANTE, M., CREWS, L., SPENCER, B., ADAME, A., PATRICK, C., TREJO, M., UBHI, K., ROHN, T. T., MUELLER-STEINER, S., SEUBERT, P., BARBOUR, R., MCCONLOGUE, L., BUTTINI, M., GAMES, D. & SCHENK, D. 2011. Passive Immunization Reduces Behavioral and Neuropathological Deficits in an Alpha-Synuclein Transgenic Model of Lewy Body Disease. *PLoS ONE*, 6, e19338.
- MATZUK, M. M. & SAPER, C. B. 1985. Preservation of hypothalamic dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 18, 552-555.
- MEISSNER, W. G., FRASIER, M., GASSER, T., GOETZ, C. G., LOZANO, A., PICCINI, P., OBESO, J. A., RASCOL, O., SCHAPIRA, A., VOON, V., WEINER, D. M., TISON, F. & BEZARD, E. 2011. Priorities in Parkinson's disease research. *Nat Rev Drug Discov*, 10, 377-393.
- METMAN, L. V., DEL DOTTO, P., VAN DEN MUNCKHOF, P., FANG, J., MOURADIAN, M. M. & CHASE, T. N. 1998. Amantadine as treatment for dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. *Neurology*, 50, 1323-1326.
- MIZUNO, Y., KONDO, T. & THE JAPANESE ISTRADefylline STUDY, G. 2013. Adenosine A2A receptor antagonist istradefylline reduces daily OFF time in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 28, 1138-1141.
- MONGE-FUENTES, V., GOMES, F. M. M., CAMPOS, G. A. A., SILVA, J. D. C., BIOLCHI, A. M., DOS ANJOS, L. C., GONÇALVES, J. C., LOPES, K. S. & MORTARI, M. R. 2015. Neuroactive compounds obtained from arthropod venoms as new therapeutic platforms for the treatment of neurological disorders. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 21, 1-9.
- MORTARI, M. R. 2007. Atividade neurobiológica e caracterização química da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis* (Hymenoptera, Vespidae): identificação de peptídeos antinociceptivos e anticonvulsivantes. Tese (Doutorado em Psicobiologia). Universidade de São Paulo- Ribeirão Preto
- MORTARI, M. R. & CUNHA, A. O. S. 2013. New Perspectives in Drug Discovery Using Neuroactive Molecules From the Venom of Arthropods, An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications, Prof. Gandhi Radis-Baptista (Ed.), ISBN: 978-953-51-1151-1, InTech.
- MIZUNO, Y., SUZUKI, K., SONE, N. & SAITOH, T. 1988. Inhibition of mitochondrial respiration by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mouse brain in vivo. *Neuroscience Letters*, 91, 349-353.
- OLANOW, C., HAUSER, R., KIEBURTZ, K., NEALE, A., RESBURG, C., MEYA, U. & BANDAK, S. 2013. A phase 2, placebo-controlled, randomized, double-blind trial of tozadenant (SYN-115) in patients with Parkinson's disease with wearing-off fluctuations on levodopa. *Neurology*, 80, 202.

- OLDS, M. E., JACQUES, D. B. & KOPYOV, O. 2006. Relation between rotation in the 6-OHDA lesioned rat and dopamine loss in striatal and substantia nigra subregions. *Synapse*, 59, 532-544.
- OUESLATI, A., FOURNIER, M. & LASHUEL, H. A. 2010. Chapter 7 - Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of α -synuclein: Implications for Parkinson's disease pathogenesis and therapies. In: ANDERS, B. & CENCI, M. A. (eds.) *Progress in Brain Research*. Elsevier.
- PAHWA, R., FACTOR, S. A., LYONS, K. E., ONDO, W. G., GRONSETH, G., BRONTE-STEWART, H., HALLETT, M., MIYASAKI, J., STEVENS, J. & WEINER, W. J. 2006. Practice Parameter: Treatment of Parkinson disease with motor fluctuations and dyskinesia (an evidence-based review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 66, 983-995.
- PALHA, J. A., NISSANOV, J., FERNANDES, R., SOUSA, J. C., BERTRAND, L., DRATMAN, M. B., MORREALE DE ESCOBAR, G., GOTTESMAN, M. & SARAIVA, M. J. 2002. Thyroid hormone distribution in the mouse brain: the role of transthyretin1. *Neuroscience*, 113, 837-847.
- PERIER, C., TIEU, K., GUÉGAN, C., CASPERSEN, C., JACKSON-LEWIS, V., CARELLI, V., MARTINUZZI, A., HIRANO, M., PRZEDBORSKI, S. & VILA, M. 2005. Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 19126-19131.
- PINNA, A. 2014. Adenosine A2A Receptor Antagonists in Parkinson's Disease: Progress in Clinical Trials from the Newly Approved Istradefylline to Drugs in Early Development and Those Already Discontinued. *CNS Drugs*, 28, 455-474.
- POSTUMA, R. B., LANG, A. E., MUNHOZ, R. P., CHARLAND, K., PELLETIER, A., MOSCOVICH, M., FILLA, L., ZANATTA, D., RIOS ROMENETS, S., ALTMAN, R., CHUANG, R. & SHAH, B. 2012. Caffeine for treatment of Parkinson disease: A randomized controlled trial. *Neurology*, 79, 651-658.
- RITZ, B., RHODES, S. L., QIAN, L., SCHERNHAMMER, E., OLSEN, J. H. & FRIIS, S. 2010. L-type calcium channel blockers and Parkinson disease in Denmark. *Annals of Neurology*, 67, 600-606.
- ROSENBLAD, C., KIRIK, D. & BJÖRKLUND, A. 2000. Sequential Administration of GDNF into the Substantia Nigra and Striatum Promotes Dopamine Neuron Survival and Axonal Sprouting but Not Striatal Reinnervation or Functional Recovery in the Partial 6-OHDA Lesion Model. *Experimental Neurology*, 161, 503-516.
- SCHALLERT, T., UPCHURCH, M., LOBAUGH, N., FARRAR, S. B., SPIRDUSO, W. W., GILLIAM, P., VAUGHN, D. & WILCOX, R. E. 1982. Tactile extinction: Distinguishing between sensorimotor and motor asymmetries in rats with unilateral nigrostriatal damage. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 16, 455-462.
- SCHAPIRA, A. H. 2013. Recent developments in biomarkers in Parkinson disease. *Current opinion in neurology*, 26, 395.
- SCHAPIRA, A. H. V., COOPER, J. M., DEXTER, D., CLARK, J. B., JENNER, P. & MARSDEN, C. D. 1990. Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry*, 54, 823-827.
- SCHAPIRA, A. H. V., OLANOW, C. W., GREENAMYRE, J. T. & BEZARD, E. 2014. Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives. *The Lancet*, 384, 545-555.

- SCHIESLING, C., KIEPER, N., SEIDEL, K. & KRÜGER, R. 2008. Review: Familial Parkinson's disease – genetics, clinical phenotype and neuropathology in relation to the common sporadic form of the disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 34, 255-271.
- SCHÖBER, A. 2004. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell and Tissue Research*, 318, 215-224.
- SCHWARZSCHILD, M. A. 2012. Caffeine in Parkinson disease: Better for cruise control than snooze patrol? *Neurology*, 79, 616-618.
- SCHWARZSCHILD, M. A., AGNATI, L., FUXE, K., CHEN, J.-F. & MORELLI, M. 2006. Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences*, 29, 647-654.
- SCHWEITZER, K., BRÜSSEL, T., LEITNER, P., KRÜGER, R., BAUER, P., WOITALLA, D., TOMIUK, J., GASSER, T. & BERG, D. 2007. Transcranial ultrasound in different monogenetic subtypes of Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, 254, 613-616.
- SEET, R. C. S., LEE, C.-Y. J., LIM, E. C. H., TAN, J. J. H., QUEK, A. M. L., CHONG, W.-L., LOOI, W.-F., HUANG, S.-H., WANG, H., CHAN, Y.-H. & HALLIWELL, B. 2010. Oxidative damage in Parkinson disease: Measurement using accurate biomarkers. *Free Radical Biology and Medicine*, 48, 560-566.
- SESTITO, R. S., TRINDADE, L. B., DE SOUZA, R. G., KERBAUY, L. N., IYOMASA, M. M. & ROSA, M. L. 2011. Effect of isolation rearing on the expression of AMPA glutamate receptors in the hippocampal formation. *Journal of Psychopharmacology*, 25, 1720-1729.
- SIAN-HÜLSMANN, J., MANDEL, S., YODIM, M. B. H. & RIEDERER, P. 2011. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 118, 939-957.
- SIDEROWF, A., JENNINGS, D., EBERLY, S., OAKES, D., HAWKINS, K. A., ASCHERIO, A., STERN, M. B., MAREK, K. & THE, P. I. 2012. Impaired olfaction and other prodromal features in the Parkinson At-Risk Syndrome study. *Movement Disorders*, 27, 406-412.
- SILVA, J., MONGE-FUENTES, V., GOMES, F., LOPES, K., ANJOS, L., CAMPOS, G., ARENAS, C., BIOLCHI, A., GONÇALVES, J., GALANTE, P., CAMPOS, L. & MORTARI, M. 2015. Pharmacological Alternatives for the Treatment of Neurodegenerative Disorders: Wasp and Bee Venoms and Their Components as New Neuroactive Tools. *Toxins*, 7, 3179.
- SINGLETON, A., FARRER, M., JOHNSON, J., SINGLETON, A., HAGUE, S., KACHERGUS, J., HULIHAN, M., PEURALINNA, T., DUTRA, A. & NUSSBAUM, R. 2003. α -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *science*, 302, 841-841.
- SMITH, G. A. & HEUER, A. 2012. 6-OHDA Toxin Model in Mouse. In: LANE, L. E. & DUNNETT, B. S. (eds.) *Animal Models of Movement Disorders: Volume I*. Totowa, NJ: Humana Press.
- SON, D. J., LEE, J. W., LEE, Y. H., SONG, H. S., LEE, C. K. & HONG, J. T. 2007. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology & Therapeutics*, 115, 246-270.
- SPILLANTINI, M. G., SCHMIDT, M. L., LEE, V. M. Y., TROJANOWSKI, J. Q., JAKES, R. & GOEDERT, M. 1997. $[\alpha]$ -Synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388, 839-840.

- STOCCHI, F. 2014. Therapy for Parkinson's Disease: What is in the Pipeline? *Neurotherapeutics*, 11, 24-33.
- SURMEIER, D. J., GUZMAN, J. N., SANCHEZ-PADILLA, J. & SCHUMACKER, P. T. 2011. The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 198, 221-231.
- SURMEIER, D. J. & SCHUMACKER, P. T. 2013. Calcium, Bioenergetics, and Neuronal Vulnerability in Parkinson's Disease. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 10736-10741.
- TAIN, L. S., MORTIBOYS, H., TAO, R. N., ZIVIANI, E., BANDMANN, O. & WHITWORTH, A. J. 2009. Rapamycin activation of 4E-BP prevents parkinsonian dopaminergic neuron loss. *Nat Neurosci*, 12, 1129-1135.
- TANI, Y., OGATA, A., KOYAMA, M. & INOUE, T. 2010. Effects of piclozotan (SUN N4057), a partial serotonin 1A receptor agonist, on motor complications induced by repeated administration of levodopa in parkinsonian rats. *European Journal of Pharmacology*, 649, 218-223.
- TON, T. G., HECKBERT, S. R., LONGSTRETH, W. T., ROSSING, M. A., KUKULL, W. A., FRANKLIN, G. M., SWANSON, P. D., SMITH-WELLER, T. & CHECKOWAY, H. 2006. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 21, 964-969.
- UNGERSTEDT, U. 1971. Postsynaptic Supersensitivity after 6-Hydroxy-dopamine Induced Degeneration of the Nigro-striatal Dopamine System. *Acta Physiologica Scandinavica*, 82, 69-93.
- VAN DEN EEDEN, S. K., TANNER, C. M., BERNSTEIN, A. L., FROSS, R. D., LEIMPETER, A., BLOCH, D. A. & NELSON, L. M. 2003. Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity. *American Journal of Epidemiology*, 157, 1015-1022.
- VINCOW, E. S., MERRIHEW, G., THOMAS, R. E., SHULMAN, N. J., BEYER, R. P., MACCOSS, M. J. & PALLANCK, L. J. 2013. The PINK1-Parkin pathway promotes both mitophagy and selective respiratory chain turnover in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 6400-6405.
- VIRGONE-CARLOTTA, A., UHLRICH, J., AKRAM, M. N., RESSNIKOFF, D., CHRÉTIEN, F., DOMENGET, C., GHERARDI, R., DESPARS, G., JURDIC, P., HONNORAT, J., NATAF, S. & TOURET, M. 2013. Mapping and kinetics of microglia/neuron cell-to-cell contacts in the 6-OHDA murine model of Parkinson's disease. *Glia*, 61, 1645-1658.
- XU, J., KAO, S.-Y., LEE, F. J. S., SONG, W., JIN, L.-W. & YANKNER, B. A. 2002. Dopamine-dependent neurotoxicity of [alpha]-synuclein: A mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat Med*, 8, 600-606.
- YAMIN, G., GLASER, C. B., UVERSKY, V. N. & FINK, A. L. 2003. Certain Metals Trigger Fibrillation of Methionine-oxidized α -Synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 27630-27635.
- YODIM, M. B. H. 2010. Why Do We Need Multifunctional Neuroprotective and Neurorestorative Drugs for Parkinson's and Alzheimer's Diseases as Disease Modifying Agents. *Experimental Neurobiology*, 19, 1-14.
- ZECCA, L., TAMPELLINI, D., GATTI, A., CRIPPA, R., EISNER, M., SULZER, D., ITO, S., FARELLO, R. & GALLORINI, M. 2002. The neuromelanin of human substantia

nigra and its interaction with metals. *Journal of Neural Transmission*, 109, 663-672.

ZHANG, W., WANG, T., PEI, Z., MILLER, D. S., WU, X., BLOCK, M. L., WILSON, B., ZHANG, W., ZHOU, Y., HONG, J.-S. & ZHANG, J. 2005. Aggregated α -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *The FASEB Journal*, 19, 533-542.

9. Apêndice

Apêndice 1

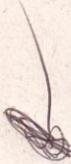

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

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.

Apêndice 2

 <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 BRASÍLIA 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</i> <i>http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/ e informar o número do protocolo 8904338536066393 para recuperá-la do banco de dados do CNPq</i></p>
--	--