



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular



Avaliação do efeito neuroprotetor da Occidentalina-1202 sobre o modelo de indução parkinsoniana em camundongos por 6-OHDA

Henrique de Oliveira Amaral

Orientadora: Prof. Dra. Márcia Renata Mortari

Brasília, DF - 2021



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular



Avaliação do efeito neuroprotetor da Occidentalina-1202 sobre o modelo de indução parkinsoniana em camundongos por 6-OHDA

Dissertação submetida como requisito para obtenção do grau de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof. Dra. Márcia Renata Mortari

Henrique de Oliveira Amaral

Orientadora: Prof. Dra. Márcia Renata Mortari

Brasília, DF – 2021

Dedicatória

Dedico este trabalho inteiramente aos meus pais:

Ao meu pai, José Augusto da Costa Amaral, um guerreiro e uma inspiração de vida para mim. Dentre as grandes batalhas que já enfrentou, nenhuma foi o suficiente para derrubá-lo. Pai, você é sem sombras de dúvidas meu herói e meu maior ídolo.

À minha mãe, Barbara de Oliveira Amaral, uma mulher que nunca deixou de sonhar grande e de correr intensamente atrás dos seus objetivos. Mãe, você que sempre me apoiou e foi a maior torcedora para que eu chegasse onde cheguei, é também uma grande vencedora. Tudo que sou hoje é graças ao que você e meu pai me ensinaram.

Não terei medo. O medo mata a mente. O medo é a pequena morte que leva à aniquilação total. Enfrentarei meu medo. Permitirei que passe por mim e através de mim. E, quando tiver passado, voltarei o olho interior para ver seu rastro. Onde o medo não estiver mais, nada haverá. Somente eu restarei.

Rito das Bene Gesserit

Agradecimentos

Um agradecimento mais que especial à minha Orientadora Márcia Renata Mortari, além de uma grande professora, uma amiga e uma mãe. Agradeço todos os dias por ter você na minha vida, uma mentora tão incrível para me guiar sobre os ensinamentos da ciência. São sete anos de trabalho juntos que eu guardo no coração como sete anos de pura diversão e ensinamentos.

Agradeço ao grupo de pesquisa do Laboratório de Neurofarmacologia da UnB, por serem essas pessoas maravilhosas que compartilharam todo esses momentos científicos comigo. Mais que colegas, vocês são grandes amigos.

Um agradecimento especial aos meus colegas de laboratório: Danilo, Larissa e Gabriel, que estiveram do meu lado em momentos difíceis e me deram o suporte necessário para concluir este trabalho.

Aos grandes amigos que tenho desde o ensino médio e faculdade, Iago, César, Hilal, Eduardo e Pedro, que me acompanha e apoiam nos meus sonhos desde o início, e ao novo amigo, Diogo, que criei nesse período de mestrado.

Um grande agradecimento à toda a minha família, aos meus pais, Augusto e Bárbara, irmãos, Débora, Rafael e Jéssica, e aos meus padrinhos, Bárbara e Carlos Alberto. Vocês me viram crescer e criar meus sonhos, me apoiando acima de tudo. É com imensa gratidão que digo a vocês que estou dando mais esse passo para um futuro recheado de ciências.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília pela oportunidade em ingressar com um projeto de mestrado.

Agradeço também ao Departamento de Ciências Fisiológicas e Instituto de Ciências Biológicas, incluindo todos os funcionários que compõem o instituto.

Por último, e não menos importante, um agradecimento ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal pelo apoio à financeiro direta e indiretamente para a execução deste trabalho.

Lista de abreviações

ANOVA	Barreira Hematoencefalica
BHE	Canal de cálcio voltagem dependente
Ca _v	Comissão de Ética no Uso Animal
CEUA	Catecol-O-metiltransferase
COMT	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CONCEA	Doença de Parkinson
DP	dopamina/dopaminérgico
DA	Transportador de dopamina
DAT	<i>(Food and Drug Administration)</i>
FDA	Ácido gama-aminobutírico
GABA	glucagon-like-peptide 1
GLP-1	Intraperitoneal
I.p	Levodopa
L-dopa	Lipopolissacarídeo
LPS	Monoamina-oxidase B
MAO-B	1-metil-4-fenilpiridínio
MPP+	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MPTP	Rotações por minuto
RPM	Subcutânea
S.c	Substancia nigra região pars compacta
SNpc	Sistema Nervoso Central
SNC	Tampão Salina Fosfato
PBS	TH
Análise de variância	6-OHDA

6-hidroxiopamina

Tirosina Hidroxilase

Sumário

Resumo	5
Abstract.....	6
Introdução	7
Propedêutica da Doença de Parkinson.....	7
Tratamentos farmacológicos para a DP.....	10
<i>Tratamentos dos sinais motores</i>	11
<i>Tratamento dos sinais não motores</i>	13
Mecanismos envolvidos na neurodegeneração na DP.....	14
<i>α-sinucleína</i>	14
<i>Disfunção mitocondrial</i>	17
<i>Desregulação da homeostase do cálcio</i>	19
<i>Neuroinflamação</i>	22
Compostos isolados da peçonha de animais para o tratamento da DP.....	24
<i>Venenos e peçonhas de animais</i>	24
<i>Peçonha da vespa <i>Polybia occidentalis</i></i>	25
Objetivos.....	27
<i>Objetivos gerais</i>	27
<i>Objetivos específicos</i>	27
Material e métodos	28
Síntese do peptídeo e análise da qualidade.....	28
Animais.....	28
Desenho experimental	29
Determinação dos grupos experimentais	30
Procedimento cirúrgico estereotáxico	32
Ensaio comportamentais	33
<i>Teste de desempenho motor utilizando o aparelho Rotarod</i>	33
<i>Teste de comportamento rotatório induzido pela injeção s.c de apomorfina</i>	34
Perfusão e histologia.....	34
Imuno-histoquímica.....	35
<i>Avaliação da viabilidade de neurônios reativos a tirosina hidroxilase</i>	35
<i>Análise por microscopia de epifluorescência</i>	35
Análise estatística	37
Resultados.....	38

Análise de sequência e pureza do peptídeo occidentalina-1202.....	38
Teste de desempenho motor sobre o aparelho Rotarod.....	38
Teste de comportamento rotatório induzido pela injeção s.c de apomorfina	40
Sobrevivência dos grupos experimentais	41
Quantificação de neurônios TH+ na SNpc	42
Discussão	45
Perspectivas futuras	57
Referências Bibliográficas.....	58
Anexos	82

Lista de figuras e tabelas

Figura 1: Fatores patológicos da DP. (A) Degeneração seletiva dos neurônios dopaminérgicos na SNpc; a ampliação do mesencéfalo demonstra a representação da SN em um indivíduo sadio e em um indivíduo com DP: do lado direito a SNpc preservada, do lado esquerdo SNpc em neurodegeneração. (B) Processo neurodegenerativo induzido pelo acúmulo da alfa-sinucleína alterada; a ampliação mostra como o processo de agregação da alfa-sinucleína se dá, começando pelos monômeros alterados, partindo para a formação dos oligômeros, fibrilas e, por fim, dos corpos de Lewy..... 9

Figura 2: Mecanismos moleculares responsáveis pelo desencadeamento do processo degenerativo dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (em vermelho). Figura esquemática abordando o envolvimento da agregação da alfa-sinucleína, neuroinflamação, desregulação da homeostase do cálcio, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. A alfa-sinucleína, ao se agregar, forma oligômeros. A partir dessa nova estrutura conformacional há desencadeamento de diferentes processos dentro do neurônio, incluindo a disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e neuroinflamação, que são responsáveis por induzir a morte celular. Além disso, os oligômeros se juntam e formam as fibrilas em folha beta, caracterizadas por sua capacidade de transmissibilidade para outros neurônios e indução de agregação de outras moléculas de alfa-sinucleína. Essas fibrilas também são responsáveis por induzir a neuroinflamação, aumentando a formação de micrógliã no seu estado pró-inflamatório (M1) e recrutamento de linfócitos T, e o estresse oxidativo. A desregulação da homeostase do cálcio também é um processo envolvido na neurodegeneração das células DA, sendo este envolvido na disfunção mitocondrial e na geração de espécies reativas de oxigênio. Por último, a disfunção mitocondrial é um dos fatores intrínsecos envolvidos na morte neuronal presente na DP, estando envolvida nos diferentes processos descritos anteriormente, mas também relacionadas com mutações gênicas ou por intoxicação de substâncias tóxicas. 17

Figura 3: Representação esquemática do protocolo experimental realizado com os animais (camundongos machos), desde os ensaios comportamentais até o dia de eutanásia. 30

Figura 4: Procedimento neurocirúrgico. Em A: exposição do crânio e da linha do bregma. B: Lesão estriatal dopaminérgica com infusão de 40 µg/4µl de 6-OHDA diretamente no Estriado esquerdo utilizando uma bomba de infusão com um fio de polietileno acoplado a uma seringa Hamilton de 10 µl (Biolchi, 2018). 33

Figura 6: Espectro de massa da occidentalina-1202, identificando duas massas equivalentes para a occidentalina-1202 $[M + Na]^+ = 1225,52$ e $[M + K]^+ = 1243,45$ Da. 38

Figura 7: Teste de desempenho motor sobre o aparelho Rotarod. Tempo em horas após lesão com 6-OHDA. Os animais foram avaliados em quatro tempos diferentes: 0, 72, 96 e 120 horas após a lesão com 6-OHDA. Grupos controles: 6-OHDA (n = 8) e grupo SHAM (n = 4). Grupos tratados com occidentalina-1202: 2 mg/kg (n = 11), 4 mg/kg (n = 8), 8 mg/kg (n = 7). Diferenças significativas ** (p < 0,01) e *** (p < 0,001) em relação ao grupo controle 6-OHDA; diferenças significativas && (p < 0,01) em relação ao grupo tratado com 2 mg/kg de occidentalina-1202; diferenças significativas + (p < 0,05) em

relação ao grupo tratado com 4 mg/kg de occidentalina-1202; diferenças significativas # ($p < 0,05$) em relação ao grupo tratado com 8 mg/kg de occidentalina-1202 {ANOVA de duas vias, diferenças significativas representadas ao longo do tempo: [F (2,797, 95,10) = 30,23; $p < 0,0001$]; entre os tratamentos aplicados: [F (4, 34) = 4,413; $p = 0,0056$]; interação tempo x tratamentos aplicados [F (12, 102) = 2,558; $p = 0,0053$]; {ANOVA de uma via, diferença significativa entre os grupos no tempo de 120 horas: [F (4, 35) = 4,894; $p = 0,0031$]}. 40

Figura 8: Análise do comportamento rotatório induzido por apomorfina (agonista dopaminérgico) injetado por via s.c. (5 ug/animal) em camundongos previamente injuriados com 6-OHDA. Grupos controles: 6-OHDA (n = 6) e SHAM (n = 4). Grupo occidentalina-1202: 2 mg/kg (n = 9), 4 mg/kg (n = 7), 8 mg/kg (n = 7). Grupos com diferenças significativas * ($p < 0,05$) {One-way ANOVA: [F (4, 30) = 3,057; $p = 0,0317$]}. 41

Figura 9: Curva de sobrevivência dos animais em cada grupo experimental aplicados. Grupos controles 6-OHDA (n = 9) e SHAM (n = 4). Grupo occidentalina-1202 (2 mg/kg n = 11), 4 mg/kg (n = 8), 8 mg/kg (n = 7). Log-rank $p = 0,3733$; Chi square = 4,250... 42

Figura 10: Representação das imunofluorescências realizadas para cada grupo experimental usado neste trabalho. Dupla marcação dos neurônios DA com citoplasmas em verde e núcleos em azul. Consideraram-se neurônios viáveis as células com citoplasmas bem definidos e que emitiam a fluorescência em verde (Alexa flúor-488) após marcação com anticorpo anti-TH e com núcleos com fluorescência azul, marcados a partir de um meio de montagem DAPI (Escala das imagens representada em 100 μm). 43

Figura 11: Determinação de porcentagem de neurônios DA viáveis imunoreativos a TH em fatias cerebrais da região SNpc de camundongos. Grupos controles: 6-OHDA (n = 6) e SHAM (n = 4). Grupos tratados com occidentalina-1202 nas doses de 2 mg/kg (n = 9), 4 mg/kg (n = 7) e 8 mg/kg (n = 7). Diferenças significativas entre o grupo 6-OHDA representado em ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$), tratado com occidentalina-1202 nas doses de 2, 4 e 8 mg/kg representados em && ($p < 0,01$), +++ ($p < 0,001$) e ### ($p < 0,001$), respectivamente {One-way ANOVA seguido do pós-teste de múltipla comparação de Tukey [F (4, 27) = 32,10; $p < 0,001$]}. Teste t não pareado mostrou diferença significativa # ($p < 0,05$) entre o grupo tratado com occidentalina-1202 na dose de 8 mg/kg e o grupo 6-OHDA ($t = 2,434$, $df = 11$; $p = 0,0332$). 44

Tabela 1: Representação dos grupos experimentais aplicados no trabalho..... 311

Resumo

A Doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa e progressiva do Sistema Nervoso Central, caracterizada pela perda seletiva de neurônios dopaminérgicos (DA) da região da substância nigra *pars compacta* (SNpc). Atualmente, a DP carece de medicamentos que possam impedir a sua progressão, sendo os tratamentos atuais direcionados para o seu alívio sintomático. Dessa forma, existe uma urgência no desenvolvimento de medicamentos que possam reverter o quadro de progressão da DP, de forma a impedir a morte progressiva dos neurônios DA. Peptídeos isolados da peçonha e veneno de animais possuem um potencial exploratório para a identificação de novos fármacos. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial efeito antiparkinsoniano e neuroprotetor do peptídeo occidentalina-1202 no modelo de lesão unilateral induzida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em camundongos. Os animais foram tratados com doses diárias de occidentalina-1202 de 8, 4 e 2 mg/kg por via subcutânea e por nove dias. Dois testes comportamentais foram selecionados para este estudo: teste de desempenho motor no Rotarod e teste de comportamento rotatório induzido por apomorfina. Além disso, foi realizada uma imunofluorescência na região da SNpc, afim de identificar neurônios positivos para a enzima tirosina hidroxilase (neurônios DA). Os resultados mostraram que a occidentalina-1202 promoveu uma melhora motora progressiva nos animais tratados com a dose de 8 mg/kg, sendo capaz de preservar 60,7% dos neurônios DA na SNpc. As doses de 2 e 4 mg/kg não tiveram efeitos positivos sobre o comportamento motor dos animais, sendo que a menor dose desempenhou um efeito protetor sobre os neurônios DA, enquanto a dose intermediária não conseguiu desempenhar o mesmo efeito. Além disso, a occidentalina-1202 não reduziu os giros contralaterais em nenhuma das doses aplicadas, provavelmente devido a intermediária extensão de lesão unilateral induzida. Por último, um achado interessante foi que a occidentalina-1202 na sua dose máxima proporcionou uma sobrevida de 100% nos animais, enquanto as doses de 4 e 2 mg/kg proporcionaram uma sobrevida de 87,5% e 81,8% respectivamente, em comparação ao grupo 6-OHDA, que teve uma sobrevida menor, de 66,7%. Dessa forma, conclui-se que a occidentalina-1202 mostrou um potencial efeito antiparkinsoniano e promissor efeito neuroprotetor, sendo capaz de preservar os neurônios DA na SNpc e desempenhar uma melhora sobre o comportamento motor dos animais.

Palavras-chaves: Doença de Parkinson; Peptídeos terapêuticos; Peçonha; Occidentalina-1202; Rotarod; 6-OHDA;

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative and progressive disorder of the Central Nervous System (CNS), featured by the selective loss of dopaminergic (DA) neurons from the substantia nigra pars compact (SNpc). At this moment, PD lacks medicines that can halt its progression and current treatment aims to the symptomatic relieve. In this sense, there is an urgency in the development of new drugs that can reverse the progression of PD, in a way of halting the progressive loss of DA neurons. Peptides isolated from animal venoms present a potential source of new medicines. Thus, the present research aimed to evaluate the potential antiparkinsonian and neuroprotective effect of the peptide occidentalin-1202 in the 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced unilateral lesion in mice. The animals were treated with three daily doses of occidentalin-1202 (8, 4, and 2 mg/kg), by subcutaneous route, for nine days. Two behavior tests were selected for this study: motor performance test in Rotarod and apomorphine-induced rotation test. Moreover, an immunofluorescence test was performed in the SNpc region in order to quantify positive neurons to the tyrosine hydroxylase enzyme (DA neurons). The results showed that occidentalin-1202 improved motor performance in animals treated with 8 mg/kg of the peptide, protecting 60.7% of DA neurons in the SNpc. The 4 and 2 mg/kg doses did not exert positive effects on animals' motor performance, in contrast to an improvement in DA neurons promoted by the lower dose. The intermediate dose had no effect on DA neuron protection. In addition, occidentalin-1202 did not improve contralateral rotations in any of the applied doses, this result was probably due to an intermediate extension of unilateral induced lesion. Lastly, occidentalin-1202 provided a 100% survival rate when applied in its maximal dose, while the doses of 4 and 2 mg/kg provided a survival rate of 87.5% and 81.8% respectively, in comparison to the 6-OHDA group, which had a minor survival rate of 66.7%. Overall, occidentalin-1202 showed a potential antiparkinsonian and neuroprotective effect, preserving DA neurons from SNpc and performing an improvement in animals' motor behavior.

Keywords: Parkinson's Disease, Therapeutics peptides, Animals venom, Occidentalinalin-1202, Rotarod; 6-OHDA

Introdução

Propedêutica da Doença de Parkinson

Com o progresso de envelhecimento populacional mundial, a maior causa de incapacidade dentre a população idosa está sendo atribuída às doenças neurológicas, em especial a Doença de Parkinson (DP) (Feigin et al. 2017). A DP trata-se de uma doença neurodegenerativa, crônica e progressiva do Sistema Nervoso Central (SNC), sendo o segundo transtorno neurodegenerativo mais comum, depois da Doença de Alzheimer, e o de crescimento mais vertiginoso (Feigin et al. 2017). Entre os anos de 1990 a 2015, a população de indivíduos com DP passou de 2,6 milhões para 6,3 milhões, tendo um aumento proporcional de aproximadamente 2,4 vezes dentro de um período de 25 anos. Dessa forma, estima-se que até os anos de 2040, o número de pacientes diagnosticados com a doença irá mais que dobrar, o que traz uma maior atenção para a DP quanto à compreensão sobre a sua patologia e busca de novos tratamentos (Feigin et al. 2017; Dorsey e Bloem 2018). A atual prevalência da DP encontra-se entre 2-3% da população acima de 65 anos de idade, tendo um aumento proporcional ao avanço da idade, sendo este o principal fator de risco para a doença (Poewe et al. 2017).

Ainda que já se tenha um avanço sobre a compreensão patológica da DP, o fator causal para o seu desenvolvimento continua obscuro. Tanto fatores genéticos como ambientais estão relacionados com o seu desenvolvimento. Estima-se que entre 10% dos indivíduos diagnosticados com a DP possuam mutações gênicas associadas com a doença, enquanto os casos classificados como esporádicos contam com quase 90% dos indivíduos (Klein e Westenberger 2012; Fleming 2017). Apesar da baixa proporção entre os casos genéticos e esporádicos, a vantagem de se conhecer os casos de mutações gênicas é a compreensão quanto à etiologia da DP, além de fornecer possíveis alvos farmacológicos. De fato, o desenvolvimento da DP envolve uma questão multifatorial de elementos que desencadeiam a doença (Kalia e Lang 2015). Dessa forma, a DP não se trata de apenas uma doença, mas sim múltiplas condições que desencadeiam em um mesmo quadro patológica, mas com causas, sintomas e progressões diferentes (Kalia e Lang 2015).

São dois os fatores neuropatológicos que descrevem a DP: o acúmulo generalizado da proteína α -sinucleína na forma de inclusões citoplasmáticas, chamadas de corpos de Lewy, e a perda seletiva de neurônios dopaminérgicos da região da *substantia nigra pars compacta* (SNpc) (Dickson et al. 2009; Halliday et al. 2011) (Figura 1 A e B). Estes neurônios possuem uma particularidade que é a pigmentação de cor escura

devido a produção de neuromelanina (Zecca et al. 2001). A perda destes neurônios dopaminérgicos (DA) leva à queda de liberação de dopamina na região do estriado, o que ocasiona na perda motora e desenvolvimento dos principais sinais da doença, sendo eles: bradicinesia, tremor em repouso, instabilidade postural e rigidez (Kalia e Lang 2015). Para o desenvolvimento dos sinais motores, estima-se uma perda entre 60-70% destes neurônios (Grosch et al. 2016). Corroborando esses dados, em um estudo com 20 encéfalos de pacientes com DP, no período entre 1-27 anos após o diagnóstico, indicou-se uma perda entre 50-90% dos neurônios da SNpc até os quatro primeiros anos de diagnóstico, caracterizando a progressão incisiva da doença (Kordower et al. 2013).

De fato, a neurodegeneração progressiva da DP inclui-se com uma piora dos sinais da doença. Em uma meta-análise, estimou-se um período de sobrevida dos pacientes entre 6,9-14,3 anos após o diagnóstico – importante destacar que os valores encontrados no estudo mostraram alta heterogenicidade (Macleod et al. 2014). É certo que os níveis de mortalidade para pacientes com DP aumentem com o avanço da idade, sendo uma das principais causas de morte devido a pneumonia por aspiração (Pennington et al. 2010).

Outras regiões do encéfalo também são afetadas pela doença, levando a perda também de neurônios não dopaminérgicos e no desenvolvimento de sinais não motores, como: hiposmia, distúrbios do sono REM, constipação (prisão de ventre) – muitos deles precedem em mais de uma década o desenvolvimento de sinais motores e são chamados de sinais prodrômicos (Braak et al. 2002; 2004; Chaudhuri et al. 2006). Possivelmente, a perda de neurônios catecolaminérgicos e colinérgicos, e dentre outros fatores patológicos que ocorrem fora da SNpc, são os responsáveis por desencadear os sinais não motores na DP (Sulzer e Surmeier 2013).

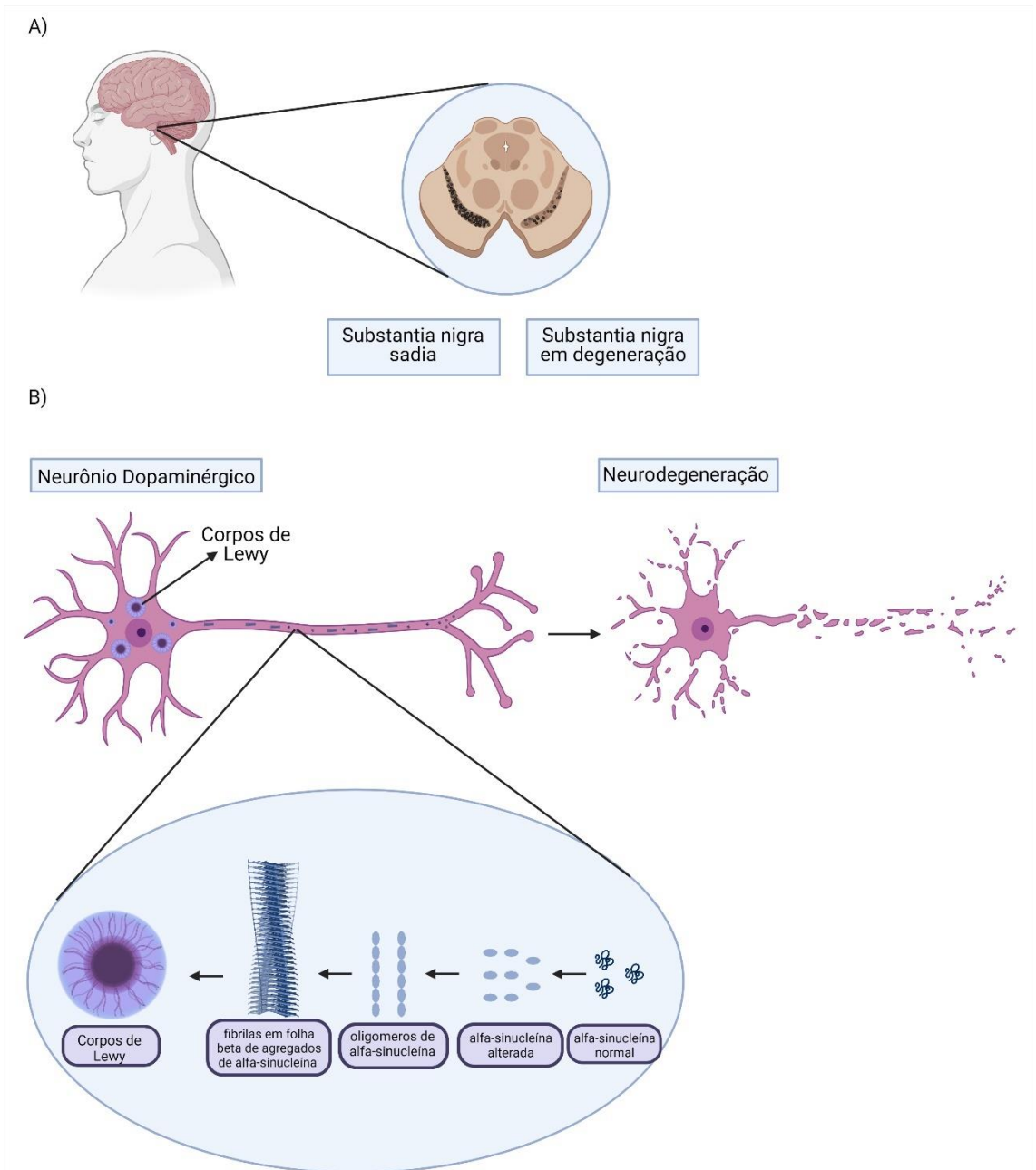


Figura 1: Fatores patológicos da DP. (A) Degeneração seletiva dos neurônios dopaminérgicos na SNpc; a ampliação do mesencéfalo demonstra a representação da SN em um indivíduo sadia e em um indivíduo com DP: do lado direito a SNpc preservada, do lado esquerdo SNpc em neurodegeneração. (B) Processo neurodegenerativo induzido pelo acúmulo da alfa-sinucleína alterada; a ampliação mostra como o processo de agregação da alfa-sinucleína se dá, começando pelos monômeros alterados, partindo para a formação dos oligômeros, fibrilas e, por fim, dos corpos de Lewy.

Apesar destes sinais prodrômicos serem indicativos de desenvolvimento da DP e possuírem uma certa sensibilidade, eles não são específicos o suficiente para serem utilizados como biomarcadores específicos e possibilitarem um diagnóstico diferencial

precoce da doença (Pilotto et al. 2017). Hoje, o diagnóstico da DP baseia-se na avaliação clínica, com exames físicos e histórico do paciente (análise dos sinais motores e não motores e histórico familiar). Dentro da avaliação física, o paciente diagnosticado com a DP deve apresentar os sinais clássicos do parkinsonismo (bradicinesia, tremor em repouso e rigidez) (Berg et al. 2015) e ao menos apresentar dois dos quatro critérios de suporte do diagnóstico. Dentre eles, (1) um sinal parkinsoniano, no caso o tremor em repouso, (2) melhora de quadro motor na aplicação de terapia dopaminérgica, (3) apresentar discinesias induzidas por terapia com Levodopa e (4) perda olfatória ou denervação simpática cardíaca por cintilografia miocárdica com metaiodobenzilguanidina – Iodo 123 (para revisão, Armstrong e Okun 2020). Outros métodos também podem ser usados para sustentação do diagnóstico, como tomografia computadorizada de emissão de fóton único do transportador de dopamina (DAT SPECT), para avaliação dos neurônios DA na SNpc (Armstrong e Okun 2020). No entanto, devido à falta de biomarcadores e toda a complexidade particular da DP, não há um diagnóstico precoce que possa identificar a doença antes dos sinais motores surgirem, tornando o desenvolvimento de terapias que impeçam a progressão da doença mais desafiador.

Tratamentos farmacológicos para a DP

Hoje, um dos principais desafios que compõe o tratamento da DP é a falta de medicamentos neuroprotetores, ou seja, fármacos que modifiquem o curso progressivo da doença e impeçam a degeneração contínua dos neurônios DA na SNpc. Particularmente, o desenvolvimento de novos tratamentos para a DP vem progredindo lentamente, sendo que a própria característica heterogênea da doença dificulta o desenvolvimento de medicamentos eficazes.

Algumas estratégias vêm sendo estudadas como potenciais alternativas. A exemplo, a terapia gênica direcionada, que mira o tratamento sobre um gene disfuncional por introdução, substituição, silenciamento ou correção do gene, são uma opção (Axelsen e Woldbye 2018). Alguns estudos clínicos já estão avançando no desenvolvimento de um tratamento eficaz para indivíduos com mutações nos genes LRRK2 (NCT03710707) e GBA (NCT02906020) (<https://clinicaltrials.gov>) (Silveira et al. 2019). Porém, não há até o momento um tratamento que possa incluir amplamente os indivíduos com DP no quesito de proteção do tecido cerebral contra a neurodegeneração progressiva.

Atualmente, os principais tratamentos para a DP se baseiam apenas no alívio sintomático. Nos tópicos a seguir, as principais terapias usadas para tratar os sinais motores e não motores serão melhor detalhadas.

Tratamentos dos sinais motores

O tratamento dos sinais motores da DP se baseia em atender a demanda de sinalização dopaminérgica entre a SNpc e o estriado. Hoje, o principal medicamento aplicado é a Levodopa (L-dopa), um precursor da dopamina que, quando administrado por via sistêmica, é absorvido pelo SNC e convertido nesse neurotransmissor ao chegar nos neurônios DA. Essa reposição de dopamina por parte dos neurônios aumentam a liberação desse neurotransmissor nas fendas sinápticas e aliviam os sinais motores, visto que a queda da neurotransmissão dopaminérgica estriatal é uma das principais características patológicas da DP. A L-dopa é considerada o “padrão ouro” de tratamento, com o seu amplo uso já passando dos seus 50 anos. Toda sua superioridade farmacológica se dá por ser o medicamento que melhor impacta na qualidade de vida dos pacientes, além do seu ótimo custo-benefício (Lewitt 2015).

No entanto, mesmo a L-dopa tendo uma ótima resposta nos pacientes, ela ainda apresenta algumas desvantagens. Por exemplo, somente uma pequena fração do composto chega até o SNC. A administração oral da L-dopa leva a sua degradação periférica precoce pelas enzimas descarboxilase. De forma a contornar esse problema de biodisponibilidade, são empregados a administração conjunta com fármacos inibidores de descarboxilases (Benserazida e Carbidopa). Estes medicamentos inibem estas enzimas, o que impede a degradação periférica da L-dopa e aumenta a sua biodisponibilidade no SNC (LeWitt 1989).

Outra desvantagem da L-dopa é a indução de discinesias – movimentos involuntários coreoatetóides que se assemelham a uma dança –, principalmente quando há o uso de doses elevadas (Turcano et al. 2018; Armstrong e Okun 2020). De fato, o aumento da dose e da frequência de administração (entre 2-3 horas) é algo gradual, de forma a acompanhar o avanço da doença. Isso acontece não por conta de aumento da tolerância dos pacientes ou perda de eficácia da L-dopa, mas devido à própria característica da DP. A perda paulatina dos neurônios DA impede que essas células armazenem a dopamina, além do paciente perder a resposta de longa e curta duração à

medicação dopaminérgica (Chou et al. 2018). Uma forma para se tratar as discinesias é a redução de medicamentos dopaminérgicos ou adicionando-se a amantadina (Fox et al. 2018).

Além da L-dopa, outros medicamentos que também são usados são os inibidores da MAO-B e os agonistas dopaminérgicos. Esses medicamentos podem ser administrados de 1 a 3 vezes por dia (dependendo da formulação) e possuem menor riscos de indução de discinesias, mas, em contrapartida, não provocam o mesmo alívio sintomático observado com a L-dopa (Gray et al. 2014). Na verdade, os agonistas dopaminérgicos possuem maior risco de efeitos adversos; o tratamento oral de ropinirol e pramipexol podem levar ao desenvolvimento de distúrbios de controle dos impulsos (gastos financeiros compulsivos, comportamentos sexuais e alimentares anormais, uso compulsivo de medicamentos) (Garcia-Ruiz et al. 2014). Além disso, pacientes tratados com agonistas dopaminérgicos ainda podem experimentar sinais de abstinência no momento de retirada desses medicamentos (ansiedade, ataques de pânico, irritabilidade, sudorese, dor) (Rabinak e Nirenberg 2010; Pondal et al. 2013).

Em virtude da complexidade do tratamento dos sinais motores da DP, a seleção de uma boa estratégia farmacológica deve ser embasada com uma conversa entre paciente e médico, considerando ambos riscos e benefícios. A combinação de medicamentos é uma opção em alguns casos avançados, como o uso da L-dopa com inibidores da MAO-B e catecol-O-metiltransferase (estes aumentam a disponibilidade de dopamina nas fendas sinápticas) (Pessoa et al. 2018).

Importante destacar novamente a inércia no desenvolvimento de novos tratamentos da DP. Nos últimos 20 anos, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou cerca de 12 medicamentos, sendo que alguns desses são considerados apenas novas formulações de terapias já existentes. A Inbrija[®] é uma nova formulação inalatória para a L-dopa, enquanto a Duopa[®] e a Rytary[®] são formulações conjuntas de L-dopa e Carbidopa. A Duopa[®] é uma suspensão enteral na forma de gel entregue diretamente para o intestino do paciente, mas que precisa de um processo cirúrgico (gastrostomia endoscópica percutânea com tubo jejunal) para instalação de uma bomba portátil que administra a L-dopa ao longo de 16 horas (Wirdefeldt et al. 2016; Wang et al. 2018); já a Rytary[®] é uma formulação de cápsula de ambos os medicamentos com liberação prolongada (Mittur et al. 2017). Dessa forma, isso demonstra a necessidade no

investimento de pesquisa para novos tratamentos neuroprotetores, de forma a aumentar o espectro de medicamentos que possam tratar e impedir a progressão da DP.

Tratamento dos sinais não motores

O tratamento dos sinais não motores em pacientes com DP tem como alvos outros neurotransmissores que não a dopamina. Essas estratégias farmacológicas se assemelham com as terapias usadas para tratar os mesmos sinais na população em geral.

No caso de pacientes com sinais de demência, o tratamento recomendado é a rivastigmina, um agonista colinérgico (Fox et al. 2018). Para casos de depressão, o tratamento farmacológico envolve tanto os inibidores seletivos da recaptação da serotonina e norepinefrina ou somente serotonina, quanto os antidepressivos tricíclicos (Fox et al. 2018).

Em casos de DP com psicose, recomenda-se primeiro fazer o desmame com medicamentos que possam contribuir para o estado de psicose do paciente; fármacos anticolinérgicos, amantadina, agonistas dopaminérgicos, inibidores da MAO-B e, às vezes, levodopa devem ser retirados e o paciente monitorado para averiguar melhor a incidência desse quadro. Caso os sintomas de psicose persistam, o uso de pimavanserina, clozapina e quetiapina é recomendado (Fox et al. 2018). Outros medicamentos antipsicóticos não são incluídos devido ao risco de piora dos sinais motores e morte (Weintraub et al. 2016; Iketani et al. 2017; Fox et al. 2018). A pimavanserina é um agonista inverso e seletivo do receptor de serotonina 5-HT_{2A}. Já a quetiapina e a clozapina são antagonistas com afinidade tanto com receptores serotoninérgicos como dopaminérgicos. A quetiapina, apesar de ser o antipsicótico mais apropriado no meio clínico, não apresentou eficácia comprovada com os estudos clínicos realizados, provavelmente pelo baixo número de indivíduos usados nesses estudos (Fox et al. 2018).

Para o tratamento de distúrbios do sono REM, recomenda-se o uso inicial de melatonina ou de clonazepam. Com relação às disfunções autonômicas, o tratamento normal fornecido para a população em geral é o mais recomendado. Nos casos de hipotensão ortostática, pode-se usar fludrocortisona, midodrina e droxidopa. Já em casos de constipação, o uso de laxantes e procinéticos em geral é o mais utilizado. Para o tratamento da disfunção sexual, a sildenafil é recomendada. Nos casos de sialorreia, condição onde há um excesso de salivação, o uso de injeções da toxina botulínica pode

ser bastante eficaz, além de agentes anticolinérgicos que também podem melhorar o quadro de disfunção urinária (para revisão Fox et al. 2018; Armstrong e Okun 2020).

No geral, a escolha de estratégia para tratamento farmacológico varia em relação ao quadro clínico do paciente, levando-se em conta as prováveis interações de fármacos que podem se desenvolver. Dessa forma, é importante que haja um consenso entre os médicos responsáveis pelo paciente e o próprio, além de também a participação dos familiares no seu acompanhamento.

A inclusão de terapias não farmacológicas também são ótimas escolhas para alguns dos sinais não motores. Como exemplos, a terapia cognitivo-comportamental e estimulação magnética transcraniana repetitiva são boas alternativas para tratar a depressão em pacientes com DP. Mais importante ainda, o cuidado próximo com estes pacientes e a presença de familiares e pessoas que possam estimulá-los, seja com jogos ou atividades físicas, é imprescindível. A apatia – perda da iniciativa e emoções atenuadas – é um dos sinais que se tornam presentes na vida dos indivíduos com DP e não há um tratamento farmacológico adequado que possa melhorar essa condição (den Brok et al. 2015; Fox et al. 2018).

Mecanismos envolvidos na neurodegeneração na DP

α -sinucleína

Como mencionado anteriormente, muitos dos casos genéticos da DP ajudaram na compreensão dos mecanismos patológicos relacionados com a neurodegeneração. A primeira mutação encontrada foi em 1997 no gene responsável pela síntese da proteína α -sinucleína, o SNCA (Polymeropoulos et al. 1997). Sugeriu-se que essa proteína fosse relacionada com o trânsito de neurotransmissores nas células nervosas, mas seu exato mecanismo nos neurônios ainda não é totalmente elucidado (Stefanis 2012). A α -sinucleína possui 140 resíduos de aminoácidos e seu estado fisiológico encontra-se de duas maneiras, na forma de monômeros e, majoritariamente, tetrâmeros, ricos em conformação de α -hélice e resistentes à agregação – ambas as conformações apresentam-se em equilíbrio dinâmico dentro da célula (Wang et al. 2011; Bartels et al. 2011; Dettmer et al. 2013). A quebra do equilíbrio entre essas conformações, induzindo a maior formação de monômeros em relação aos tetrâmeros, leva ao acúmulo de α -sinucleína –

mudando a sua conformação para folha- β – na forma de fibrilas, formando em seguida os corpos de Lewy (Figura 1 B) (Dettmer et al. 2015).

De fato, a agregação de α -sinucleína pode ser induzida tanto por fatores ambientais quanto por fatores genéticos. Muitas das mutações encontradas sobre o gene SNCA, e responsáveis pelo desenvolvimento das formas familiares da DP, estão associadas com a quebra do equilíbrio fisiológico das suas formas monoméricas e tetraméricas (Dettmer et al. 2015). Dentre essas mutações, pode-se encontrar trocas de resíduos de aminoácidos em pontos específicos da proteína (A53T, A30P, E46K, H50Q, G51D e A53E) ou multiplicação do gene SNCA (Dehay et al. 2015). Outros tipos de mutações associadas ao desenvolvimento da DP também desestabilizam a homeostase fisiológica da α -sinucleína, como mutações sobre a proteína LRRK2 (maior fator de risco genético para formas familiares da DP) e GBA (maior fator de risco genético para formas esporádicas da DP) (Volpicelli-Daley et al. 2016; Sidransky et al. 2009).

Dessa forma, estes agregados proteicos são os responsáveis por induzir uma série de eventos tóxicos nos neurônios, como a neuroinflamação, estresse oxidativo, distúrbio mitocondrial, prejuízo na homeostase do cálcio intracelular e comprometimento dos sistemas ubiquitina-proteassoma e da autofagia lisossomal (Figura 2) (Poewe et al. 2017). Além disso, uma característica importante para estes agregados proteicos é a sua capacidade priônica, em que fibrilas de α -sinucleína podem ser transmitidas através do transporte intra-axonal para outras regiões do sistema nervoso e induzir a agregação desta mesma proteína em outros neurônios (Angot et al. 2010; Brundin et al. 2010). Os agregados de α -sinucleína também são liberados no meio extracelular por exocitose e incorporados por outros neurônios pelo processo de endocitose (Figura 2) (Angot et al. 2010; Brundin et al. 2010).

A hipótese priônica da α -sinucleína coincide com uma das hipóteses mais bem estabelecidas para a progressão da doença, a hipótese de Braak e colaboradores. Braak et al (2002) descreveu os estágios patológicos relacionados a agregação da α -sinucleína, começando pelo sistema olfatório ou entérico (estágios 1 e 2; assintomáticos), atingindo em seguida sobre as regiões do mesencéfalo e do prosencéfalo (estágios 3 e 4; desenvolvimento dos sinais motores) e chegando por último em regiões cerebrais límbicas e neocorticais, em estágios mais avançados da doença (estágios 5 e 6) (Braak et al. 2002). Além disso, esta hipótese também sustenta a ideia de que os agregados de α -sinucleína são inicialmente formados no trato gastrointestinal e chegam até o mesencéfalo

através do nervo vago (Berg et al. 2015). Estas fibrilas se formam acompanhando o desenvolvimento dos sinais iniciais da DP de hiposmia e constipação, antecedendo os sinais motores, momento em que os agregados proteicos já atingiram a SNpc (George et al. 2013).

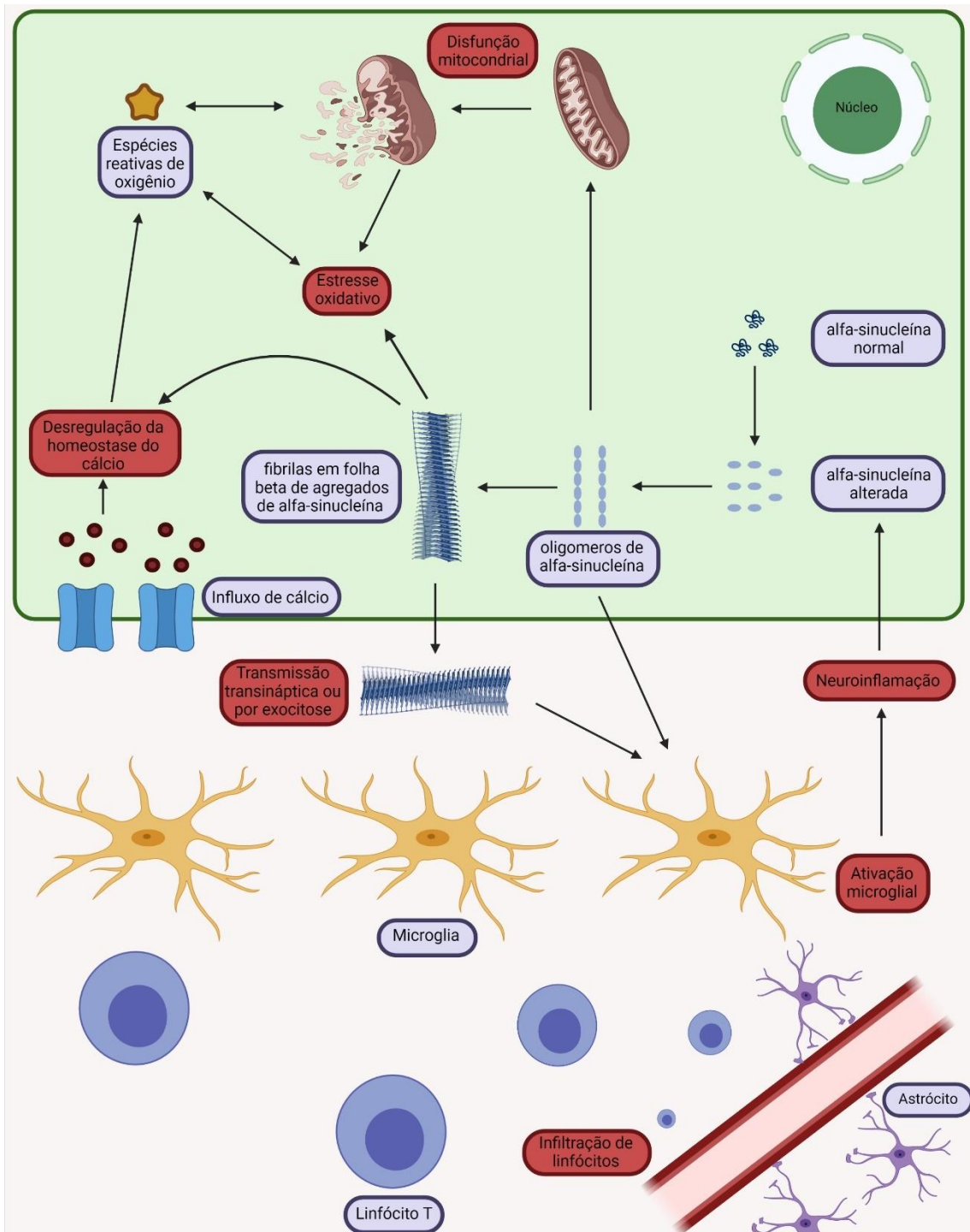


Figura 2: Mecanismos moleculares responsáveis pelo desencadeamento do processo degenerativo dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (em vermelho). Figura esquemática abordando o envolvimento da agregação da alfa-sinucleína, neuroinflamação, desregulação da homeostase do cálcio, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. A alfa-sinucleína, ao se agregar, forma oligômeros. A partir dessa nova estrutura conformacional há desencadeamento de diferentes processos dentro do neurônio, incluindo a disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e neuroinflamação, que são responsáveis por induzir a morte celular. Além disso, os oligômeros se juntam e formam as fibrilas em folha beta, caracterizadas por sua capacidade de transmissibilidade para outros neurônios e indução de agregação de outras moléculas de alfa-sinucleína. Essas fibrilas também são responsáveis por induzir a neuroinflamação, aumentando a formação de micróglia no seu estado pró-inflamatório (M1) e recrutamento de linfócitos T, e o estresse oxidativo. A desregulação da homeostase do cálcio também é um processo envolvido na neurodegeneração das células DA, sendo este envolvido na disfunção mitocondrial e na geração de espécies reativas de oxigênio. Por último, a disfunção mitocondrial é um dos fatores intrínsecos envolvidos na morte neuronal presente na DP, estando envolvida nos diferentes processos descritos anteriormente, mas também relacionadas com mutações gênicas ou por intoxicação de substâncias tóxicas.

Disfunção mitocondrial

As mitocôndrias são organelas ligadas à membrana responsáveis por uma série de funções intracelulares, como: produção de ATP, metabolismo e síntese de macromoléculas (lipídeos, aminoácidos e nucleotídeos), formação de tampões de espécies reativas de oxigênio (ERO) e cálcio (Ca^{2+}) citoplasmático, regulação do equilíbrio redox celulares, controle dos mecanismos de apoptose e sustentação de redes de sinalização intracelular (Scarffe et al. 2014; Bose e Beal 2016; Spinelli e Haigis 2018).

Dentro do SNC, as mitocôndrias agem sobre uma maior demanda energética, seja pela atividade neuronal ou pela polarização estrutural dessas células. Além disso, neurônios são células pós-mitóticas, o que recai ainda mais o rigor sobre a atividade mitocondrial, visto que diferente das células somáticas, os neurônios permanecem com as mitocôndrias por toda a sua sobrevida. Apesar de suas funções serem críticas para os neurônios, os processos bioquímicos exercidos nas mitocôndrias geram intermediários reativos de oxigênio que danificam ácidos nucleicos, proteínas e lipídios. Dessa forma, o controle de qualidade quanto a atividade das mitocôndrias são imprescindíveis no neurônio, afim de se evitar o excesso de moléculas reativas que possam danificar as células nervosas (Grenier et al. 2013; Scarffe et al. 2014; Spinelli e Haigis 2018).

A hipótese da disfunção mitocondrial como um dos fatores patológicos envolvidos na etiologia da DP veio com a descoberta do componente 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-

tetrahidropiridina (MPTP). O MPTP é um subproduto da síntese do opioide sintético desmetilprodina e é o precursor do 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP⁺), sendo essa última molécula o produto neurotóxico responsável por inibir o complexo 1 das mitocôndrias e induzir ao estresse oxidativo nos neurônios. O MPTP foi inicialmente identificado em 1983 em quatro pacientes intoxicados com a droga e que desenvolveram um quadro agudo de parkinsonismo, com perda seletiva dos neurônios dopaminérgicos na SNpc (Langston et al. 1983). Desde então, o MPTP vem sendo amplamente usado como modelo animal parkinsoniano, envolvendo estudos sobre a mitocôndria como fator central da DP e implicando em hipóteses para as características fisiopatológicas, epidemiológicas e genéticas da doença.

Além do MPTP, uma série de outros fatores também correlacionam o envolvimento da disfunção mitocondrial sobre a DP. O primeiro deles é a exposição à rotenona, um pesticida amplamente usado para controle de pragas e com ação inibitória no complexo 1 mitocondrial. A exposição direta à rotenona está associada com um alto risco para o desenvolvimento da DP, principalmente em regiões rurais (Dawson e Dawson 2003; Tanner et al. 2011). Outro fator é a presença de disfunção do complexo 1 da mitocôndria e de defeitos genéticos – acúmulo de deleções do DNA mitocondrial – em tecidos *post-mortem* de pacientes (Schapira et al. 1989; Grünewald et al. 2016; Coxhead et al. 2015; Dölle et al. 2016; Giannoccaro et al. 2017). Por último, a presença de mutações gênicas sobre a mitocôndria em casos de formas familiares, envolvendo os genes PINK1, que codifica a enzima serina/treonina quinase 1 induzida por PTEN, e Parkin, que codifica uma ubiquitina ligase E3 (Kitada et al. 1998; Valente et al. 2004; Scarffe et al. 2014; Giannoccaro et al. 2017). Ambos os genes possuem funções cruciais para o controle de qualidade das mitocôndrias, desde a detecção de sua disfunção até sinalização para remoção e substituição da organela (Ge et al. 2020). As mutações sobre os genes PINK1 e Parkin em pacientes com as formas familiares da DP estão associados ao desenvolvimento precoce da doença, com os sinais motores aparentes antes dos 45 anos de idade (Kitada et al. 1998; Valente et al. 2004; Houlden e Singleton 2012).

Um outro fator que também deve ser levado em conta para o envolvimento da disfunção mitocondrial na DP é a suscetibilidade da região da SNpc para com o estresse oxidativo, principalmente devido à alta demanda bioenergética exercida por essa organela. Como mencionado anteriormente, por se tratarem de células pós-mitóticas, os neurônios convivem com as respectivas mitocôndrias por todo o seu período de vida.

Ainda assim, os neurônios da SNpc possuem grandes extensões axoniais, incluindo diversas ramificações, por regiões grandes do cérebro (Surmeier et al. 2017). Estima-se que entre 1-2 milhões de sinapses são formadas entre a SNpc e o estriado (Misgeld e Schwarz 2017). Além disso, neurônios dopaminérgicos da SNpc possuem axônios complexos e amielinizados, com maior densidade mitocondrial, produções superiores de superóxidos e altas taxas de fosforilação oxidativa (Bolam e Pissadaki 2012; Pacelli et al. 2015). Dessa forma, uma marca para os neurônios desta região é a complexidade citoarquitetural que acaba por exigir uma maior demanda bioenergética. Tudo isso contribui para uma maior vulnerabilidade dessas células e menor controle para restauração à possíveis estresses, o que proporciona o desencadeamento de eventos tóxicos para o neurônio.

Desregulação da homeostase do cálcio

O Ca^{2+} é um importante segundo mensageiro com diversas funções em células eucarióticas, participando de eventos vitais como: proliferação, crescimento, sobrevivência e diferenciação celular, além de também agir na regulação da excitabilidade de membranas, apoptose e transcrição gênica (Clapham 2007; Capiod 2016; La Rovere et al. 2016; Toth et al. 2016). Nos neurônios, o Ca^{2+} é um fator essencial na manutenção fisiológica neuronal, tanto nos processos de transmissão de sinais despolarizantes e na plasticidade sináptica, quanto em maquinarias proteicas complexas que dependem dessa molécula (quinases, fosfatases, fatores de transcrição, enzimas e proteínas que induzem a fusão de vesículas em sinapses nervosas) (Berridge 1998; Clapham 2007; Brini et al. 2014).

No entanto, por mais que o Ca^{2+} desempenhe processos vitais nos neurônios, essas células ainda são sensíveis a menor variação de sua concentração intracelular, tornando-as mais vulneráveis aos diferentes estresses que possam interferir na homeostase dessa molécula. A exemplo, o desencadeamento de múltiplos processos moleculares Ca^{2+} -dependentes ao mesmo tempo podem aumentar a concentração intracelular dessa molécula, e uma falha em manter seu equilíbrio, em conjunto ao defeito em outras vias neuronais que contribuam para a citotoxicidade, podem provocar alterações no desempenho normal dos neurônios e induzir a morte celular. Dessa forma, a manutenção da homeostase do cálcio intracelular é de extrema importância na proteção dos neurônios contra potenciais estresses (Pchitskaya et al. 2018). Em especial, sua desregulação

também é um dos mecanismos patológicos associados com a perda seletiva de neurônios DA na DP e a morte celular observada em outras doenças neurodegenerativas (Bezprozvanny 2009; Michel et al. 2016).

Dentre as múltiplas hipóteses que associam a morte de neurônios DA na SNpc por defeitos na homeostase do Ca^{2+} na DP, fatores como a agregação da α -sinucleína, deficiência mitocondrial ou desregulação do retículo endoplasmático (RE) são considerados condições que aumentam a concentração de Ca^{2+} intracelular e desencadeiam os subseqüentes eventos tóxicos nos neurônios (Figura 2) (Michel et al. 2016).

Em uma das outras hipóteses para o aumento de Ca^{2+} nos neurônios, sugere-se uma ativação contínua de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) – receptores de glutamato que permitem a entrada de Ca^{2+} nos neurônios – pela superativação do Núcleo Subtalâmico, região que compõe os núcleos da base (Blandini et al. 2004). Dentro dessa hipótese, inclui-se a ideia de excitotoxicidade, em que devido aos percalços ocasionados na região dos núcleos da base, as vias glutamatérgicas são hiperestimuladas ao nível de aumentar excessivamente o glutamato nas fendas sinápticas e induzir o estresse celular nos neurônios pós-sinápticos (Assous et al. 2014). No entanto, mesmo que este processo possibilite o aumento de cálcio intracelular, ele não é bem estabelecida pelo fato de que a sobrecarga de Ca^{2+} associada a morte neuronal pode ser induzida mesmo em níveis normais de excitação glutamatérgica (Blandini et al. 2004; Michel et al. 2016).

Outra hipótese indica que a deficiência na manutenção homeostásica do Ca^{2+} é um resultado de descargas elétricas desajustadas dos neurônios DA (Michel et al. 2016). É importante destacar que esses neurônios possuem uma característica singular em relação às outras células do SNC. Os neurônios DA na SN são capazes de disparar potenciais de ação espontâneos e autônomos, sem a necessidade de ativação sináptica (Puopolo et al. 2007; Guzman et al. 2009). Acredita-se que a importância desta característica seja pela necessidade de manutenção basal dos níveis de dopamina nas regiões inervadas pela SN, no caso, o estriado (Romo e Schultz 1990).

Os canais de Ca^{2+} responsáveis por executar a atividade autônoma dos neurônios DA na SN são os de $\text{Ca}_v1.3$ do tipo L, que levam a entrada do Ca^{2+} na célula seguida de sua despolarização (Chan et al. 2007). Esse influxo contínuo do Ca^{2+} , associado pela baixa capacidade de tamponamento desses neurônios, induz o estresse oxidativo por

alteração da função mitocondrial, além de também aumentar a concentração de Ca^{2+} no RE e comprometer o processamento de proteínas (Chan et al. 2007; Chan et al. 2009; Surmeier et al. 2012; Surmeier et al. 2017). Devido ao aumento de estresse oxidativo induzido na mitocôndria, há um prejuízo na capacidade de reservas bioenergéticas nos neurônios. Este impacto acaba por aumentar a vulnerabilidade dos neurônios DA na SN, principalmente em momentos de alta demanda metabólica, questão recorrente nessas células por toda a sua estrutura e característica fisiológica (Rivero-Ríos et al. 2014; Surmeier et al. 2017).

Um outro cenário associado à morte neuronal por alteração da homeostase do Ca^{2+} na DP é pelo aumento da atividade metabólica da tirosina hidroxilase (TH) (Rittenhouse e Zigmond 1999). A sobrecarga de Ca^{2+} nos neurônios induz a síntese de DA pela enzima TH (Brosenitsch e Katz 2001), o que leva a autoxidação de neurotransmissores ou modificações pós-traducionais na α -sinucleína e, por consequência, ao dano neuronal (Michel et al. 1990; Martinez-Vicente et al. 2008).

Por mais diferentes que sejam as vias que convergem para a sobrecarga de Ca^{2+} nos neurônios, a manutenção da função ótima das mitocôndrias é o fator essencial na proteção dessas células em situações de desequilíbrio da homeostase do Ca^{2+} . É a partir das mitocôndrias que são regulados os mecanismos de tamponamento do Ca^{2+} intracelular, sejam por captação ou mecanismo de efluxo (Celardo et al. 2014). A exemplo, mutações na proteína PINK1 alteram a atividade de efluxo de Ca^{2+} das mitocôndrias, levando ao acúmulo dessa molécula (Gandhi et al. 2009). Além disso, diversos estudos incluem a sobrecarga de Ca^{2+} nas matrizes mitocondriais como um dos fatores que induzem o estresse oxidativo, contribuindo para o suporte de múltiplos fatores patológicos que, subsequentemente, induzem a neurodegeneração observada na DP (Guzman et al. 2010; Qiu et al. 2013; Celardo et al. 2014).

Em contrapartida ao aumento de Ca^{2+} intracelular, a sua diminuição também pode ser responsável pela neurodegeneração encontrada na DP (Michel et al. 2013). Hirsch e colaboradores (1988) identificaram que a enzima TH é ausente nos neurônios DA na SN em parte da população diagnosticada com DP (Hirsch et al. 1988). Como o Ca^{2+} é importante na expressão e ativação da TH (Brosenitsch e Katz 2001), a ausência dessa enzima pode ser associada com uma queda dos níveis de Ca^{2+} nesses neurônios. Além disso, em um estudo avaliando camundongos transgênicos com alta expressão da proteína SNCA (gene responsável pela síntese de α -sinucleína), observou-se uma redução de

disparos elétricos, bem como na frequência dos neurônios DA na SN, comprometendo a transmissão dopaminérgica e a organização vesicular (Janezic et al. 2013). Sugere-se que a incapacitação dos neurônios DA seja devido as formas pré-agregadas da α -sinucleína, que impediram a atividade normal de disparos elétricos.

De fato, ambas as hipóteses de aumento e diminuição de Ca^{2+} intracelular incluem-se como fatores patológicos para indução da neurodegeneração na DP. Acrescenta-se também no fato de que o ambiente fisiológico dos neurônios DA na SN compõe-se de suscetíveis momentos de altas e baixas ativações dessas células, que por sua vez deturpam a homeostase do Ca^{2+} tanto na sua sobrecarga, quanto na sua queda de concentração. Estes fatores acabam por influenciar negativamente na estabilidade destes neurônios e aumentam a sua suscetibilidade à neurodegeneração.

Neuroinflamação

Assim como a perda de neurônios dopaminérgicos da SNpc e a presença de inclusões intraneurais de α -sinucleína na forma de corpos de Lewy são as bases características da DP, um outro fator também presente é a excessiva gliose ocorrente no encéfalo dos pacientes diagnosticados (Tansey e Romero-Ramos 2019). A primeira identificação de uma potencial associação entre inflamação e a DP se deu em 1988 com o trabalho de McGeer e colaboradores (1988), que identificaram intensa ativação microglial e infiltração de linfócitos na SN de encéfalos *post-mortem* de pacientes (McGeer et al. 1988).

De fato, após a publicação do trabalho destes autores, a hipótese de processo inflamatório relacionado com a neurodegeneração na DP trouxe uma nova linha a ser explorada. Hoje, uma série de estudos trabalham em torno de compreender a neuroinflamação presente nos pacientes, observando-se o comportamento da resposta imune inata, com foco sobre a micróglia, e a influência da infiltração dos linfócitos sobre a progressão da DP (Hirsch e Standaert 2021). Porém, o fator causal que induz o processo inflamatório ainda é desconhecido, envolvendo em suas hipóteses os restos de neurônios DA em degeneração, α -sinucleína ou a presença de um fator externo como a alteração da microbiota intestinal (para revisão Hirsch e Standaert 2021). Seja pela ação de apenas um desses fatores ou a combinação dos três na responsabilização pela neuroinflamação na DP, o tecido nervoso encefálico permanece em um ciclo de neurodegeneração e este

ambiente inflamatório contribui para a progressão da doença. Portanto, compreender melhor como o processo inflamatório ocorre na DP é uma linha de estudo importante para a identificação de fármacos que impeçam a neurodegeneração progressiva da doença.

Começando pela resposta imune inata presente na doença, a principal célula associada com essa resposta é a micróglia, a célula imune residente no SNC. Sua função de policiamento permite manter a homeostase no meio, agindo na detecção e fagocitose de patógenos e na neuromodulação e neuroplasticidade (Prinz et al. 2011; Weinhard et al. 2018). A micróglia é regulada por sinais estabelecidos pelo SNC e também pode sofrer influência de sinalizações periféricas durante o desenvolvimento do encéfalo e por toda a vida adulta (Matcovitch-Natan et al. 2016). A partir da sinalização e ativação da célula glial, a micróglia pode atingir dois estados principais: os estados pró-inflamatório “M1” e anti-inflamatório “M2”. A proporção destes dois estados fundamentais define o processo inflamatório no tecido nervoso, sendo a ativação do estado “M1” o responsável pela ação citotóxica e o “M2” relacionado à uma ação de controle da inflamação e proteção dos neurônios (Imamura et al. 2003; Ouchi et al. 2005; Iannaccone et al. 2013; Doorn et al. 2014).

Além disso, a infiltração de monócitos derivados de macrófagos no SNC é outro passo associado com a resposta imune inata na DP. Ambas micróglias e monócitos trabalham juntos no SNC liberando citocinas pró e anti-inflamatórias, trazendo uma resposta imune variada durante o processo de neurodegeneração (Parillaud et al. 2017). A múltipla capacidade de ação para as micróglias residentes e para os monócitos derivados de macrófagos podem ter atividades neuroprotetoras ao suprimir o processo inflamatório, reconhecendo e limpando oligômeros e fibrilas de α -sinucleína, restos de neurônios em degeneração e secretando citocinas anti-inflamatórias. Por outro lado, ambas células também podem exacerbar a neuroinflamação presente ao liberar citocinas pró-inflamatórias e induzir a infiltração de linfócitos para a ativação da resposta imune adaptativa (Figura 2) (Hirsch e Standaert 2021).

A resposta imune adaptativa também está presente na DP. A infiltração de células T no encéfalo foram reportadas tanto em estudos com pacientes (Brochard et al. 2009) como em modelos animais (Theodore et al. 2008; Brochard, Combadière et al. 2009; Sanchez-Guajardo et al. 2010; Harms et al. 2017). Brochard e colaboradores (2009) observaram a presença de linfócitos T CD4 e CD8 no modelo de MPTP, com maior presença de células CD4 durante a neurodegeneração (Brochard et al. 2009). Em um

estudo com neurônios do mesencéfalo derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC), foi identificada as células Th17 como tendo participação no processo de degeneração. Além de também terem sido identificados no sangue de pacientes e no tecido cerebral *post-mortem* (Sommer et al. 2018). Porém, estudos ainda são necessários para identificar os linfócitos principais responsáveis pela morte dos neurônios DA na DP.

Um outro ponto importante a se destacar na resposta imune adaptativa na DP é o reconhecimento de peptídeos da α -sinucleína como antígenos apresentados por MHCII na membrana de micróglia, induzindo a proliferação e infiltração dos linfócitos T em camundongos com superexpressão viral de α -sinucleína (Harm et al. 2013). Células T de pacientes com DP também reconheceram peptídeos da α -sinucleína, o que sugere que essa proteína tenha ação central no desenvolvimento da resposta imune adaptativa na DP (Sulzer et al. 2017; Lindestam Arlehamn et al. 2020). Porém, a real função dos linfócitos, seja para a proteção ou exacerbação do quadro de neurodegeneração, ainda não foi bem esclarecida.

Compostos isolados da peçonha de animais para o tratamento da DP

Venenos e peçonhas de animais

Venenos e peçonhas de animais são resultados de milhões de anos de pressão evolutiva para a seleção de moléculas utilizadas nas relações presas-predadores – configurando mecanismos eficientes de defesa ou predação, que podem envolver efeitos de paralisia, por exemplo (Mortari et al. 2007). Acontece que, devido à essa pressão evolutiva, algumas dessas moléculas desenvolveram atividades extraordinárias na interação com receptores celulares de mamíferos, particularmente em receptores dos sistemas nervoso e cardiovascular. Estes compostos derivados de venenos e peçonhas apresentam uma ampla potência e alta seletividade e afinidade com os receptores celulares, dando a eles a capacidade de interagir com processos fisiológicos e bioquímicos vitais para as células (Fry et al. 2009; King 2011). De fato, os venenos de animais já são amplamente investigados no tratamento de diferentes doenças, como o câncer (Pennington et al. 2018; Clark et al. 2019), dor (Gazerani e Cairns 2014; Gazerani 2017), doenças cardiovasculares e autoimunes (Chen et al. 2018). Dessa forma, todas essas características farmacológicas trazem um alto interesse para com essas moléculas no desenvolvimento de novos medicamentos.

No caso da peçonha de espécies de invertebrados, elas são em geral heterogêneas e apresentam uma variedade de compostos em sua composição, dentre eles estão: peptídeos, aminas biogênicas, enzimas, sais inorgânicos, pequenas moléculas orgânicas (< 1 kDa) e moléculas de alto peso molecular (> 10 kDa) (King 2011). Os peptídeos derivados de peçonhas são os compostos de maior interesse farmacológico, justamente por serem as moléculas que apresentam alta seletividade a receptores celulares, além de transportadores e canais iônicos em neurônios excitatórios e inibitórios (Mortari et al. 2007).

Dessa forma, a vasta capacidade destes peptídeos em interagir com processos fisiológicos e bioquímicos dos neurônios aumenta o interesse para o desenvolvimento de medicamentos no tratamento de desordens neurológicas, como a DP, Doença de Alzheimer, Doença de Huntington e epilepsia (Monge-Fuentes et al. 2015; Silva et al. 2015; Amaral et al. 2019). O interesse principal destas moléculas é pela sua capacidade em modificar o curso progressivo dessas desordens, de forma a proteger o tecido do SNC dos fatores neuropatológicos.

*Peçonha da vespa *Polybia occidentalis**

A vespa *Polybia occidentalis* é um himenóptero pertencente à família Vespidae, e é amplamente distribuída em regiões neotropicais, sendo abundante em muitos estados do Brasil, principalmente em regiões rurais (Jeanne 1980; Resende et al. 2001). A *P. occidentalis* é uma vespa eusocial, não agressiva e uma característica interessante para esta vespa é a sua capacidade redutora de herbivoria, agindo como controle de pragas em diversas áreas agrícolas, devido a sua dieta envolver formigas, cupins, hemípteros e lepidópteros (Resende et al. 2001).

A peçonha da *P. occidentalis* é constituída por proteínas de alta massa molecular, peptídeos, aminas biogênicas e sais inorgânicos, com uma composição majoritária de 70% de peptídeos (Mortari et al. 2005). Em um estudo realizado por Mortari e colaboradores (2005) com os compostos de baixa massa molecular da peçonha bruta da *P. occidentalis*, observou-se um efeito anti-convulsivante dose dependente em três modelos de crises epiléticas induzidas pelos compostos: ácido caínico (DE₅₀ 44 mg/ml), bicuculina (DE₅₀ 57 mg/ml) e pricotoxina (DE₅₀ 75 mg/ml) (Mortari et al. 2005).

A partir destes estudos, foi identificado o peptídeo neuroativo, denominado occidentalina-1202, que desempenhou o efeito anticonvulsivante observado pelos compostos de baixa massa molecular da peçonha bruta. A occidentalina-1202 é um peptídeo com massa molecular de 1202 Da e 9 resíduos de aminoácidos: Glu-Gln-Tyr-Met-Val-Ala-Phe-Trp-Met-NH₂. Em um novo estudo realizado por Mortari (2007), observou-se que a occidentalina-1202 foi capaz de proteger ratos contra crises induzidas por ácido caínico e pentilenotetrazol de forma dose dependente e com DE₅₀ de aproximadamente 0,35 e 0,78 µg/animal, respectivamente, quando injetada de forma intracerebroventricular. A DE₅₀ também foi estimada por administração por via i.p., identificou-se um valor aproximado de 1,88 mg/kg no modelo de indução de crises epiléticas por ácido caínico em camundongos (Mortari 2007).

Além disso, Schwartz (2020) identificou que o mesmo peptídeo apresenta uma meia-vida equivalente a 6 horas em soro sanguíneo diluído em salina (25%) de camundongos *Swiss* (Schwartz 2020). O peptídeo occidentalina-1202 também apresentou efeitos anticonvulsivantes no modelo crônico de epilepsia induzido por pilocarpina e teve um promissor efeito neuroprotetor ao reduzir a expressão da proteína C-fos na região hipocampal (Giro denteado, CA1 e CA3) de camundongos injetados com ácido caínico (Carneiro, 2013).

Dessa forma, tendo em vista o já promissor efeito neuroprotetor da occidentalina-1202 descrito em modelo de indução química de crises epiléticas. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer o potencial do uso da occidentalina-1202 como agente antiparkinsoniano/neuroprotetor em modelo animal de DP. Para tanto, este trabalho destaca-se por aumentar a frequência de administração do peptídeo, aplicando-o todos os dias durante o protocolo experimental por via subcutânea, afim de se obter resultados mais robustos sobre seu potencial efeito no tratamento da DP.

Objetivos

Objetivos gerais:

Avaliação do efeito antiparkinsoniano e neuroprotetor da occidentalina-1202, administrado subcronicamente por via subcutânea, no modelo de indução hemiparkinsoniana pela neurotoxina 6-OHDA em camundongos.

Objetivos específicos:

- Avaliação do efeito do peptídeo occidentalina-1202 no desempenho motor de camundongos após lesão unilateral da SNpc, por injeção intraestriatal de 6-OHDA.
- Avaliação da atividade antiparkinsoniana da occidentalina-1202 a partir da quantificação de giros contralaterais no teste de rotação induzido pela injeção subcutânea de apomorfina.
- Avaliação do potencial efeito neuroprotetor da occidentalina-1202 a partir da quantificação de neurônios dopaminérgicos reativos a TH da região da SNpc, por meio da técnica de imunofluorescência.
- Avaliação da taxa de sobrevivência dos animais após lesão unilateral do SNpc, correlacionando cada grupo aplicado no estudo.

Material e métodos

Síntese do peptídeo e análise da qualidade

O peptídeo occidentalina-1202 (sequência: Glu-Gln-Tyr-Met-Val-Ala-Phe-Trp-Met-NH₂) foi sintetizado pela empresa Biointech[®]. A pureza e sequência foram verificadas e confirmadas junto com a empresa e o Laboratório de Neurofarmacologia da Universidade de Brasília, considerando-se a pureza > 95%.

A massa monoisotópica e grau de pureza da occidentalina-1202 foram realizadas por Espectrometria de Massas, bem como a confirmação de sequência do peptídeo por sequenciamento *De Novo*. O método MALDI-TOF/TOF no espectro de massas Autoflex speed (Bruker Daltonics, Alemanha) foi utilizado no modo positivo [M+Na]⁺ e [M+K]⁺. Uma alíquota do peptídeo foi ressuspensa em água deionizada e misturada a uma matriz pronta de ácido α -cyano-4-hidroxi-cinâmico em acetonitrila/água deionizada/3% de ácido trifluoracético, 5/4/1, v/v/v e, posteriormente, essa mistura foi aplicada em triplicata em uma placa Bruker MTP Massive 384. Após a secagem e cristalização das amostras em temperatura ambiente, cada aplicação foi analisada.

O espectro de massas estava equipado com laser SmartBeam e foram utilizados em dois modos de operação, o refletido positivo, para a obtenção de espectros de MS, e o LIFT, para a obtenção de espectros de MS/MS. A faixa de detecção da razão massa/carga (m/z) foi de 600 a 3000. A calibração foi realizada com a mistura Peptide Calibration Standard I (Bruker Daltonics, Alemanha). O software utilizado nessas análises foi o FlexControl 3.0. Alíquotas do peptídeo foram submetidas às análises citadas a cada seis meses a fim de monitorar e garantir a estabilidade do composto em estudo.

Para os ensaios *in vivo* realizados, a occidentalina-1202 foi solubilizada em uma solução fisiológica (NaCl) a 0,9% com 20% de DMSO.

Animais

No presente trabalho foram utilizados camundongos *Swiss (Mus musculus)* machos com idade entre 5 a 7 semanas e peso variando entre 20 a 30 g. Os animais foram adquiridos do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília e mantidos em condições controladas de luz (ciclo de 12 horas claro e escuro) e temperatura (35° C), recebendo água e ração *ad libitum*. A manipulação dos animais seguiu os

Princípios Éticos na Experimentação Animal – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 1991), seguindo a lei AROUCA 11794. Além disso, o presente projeto foi submetido e aprovado pelo CEUA-UnB protocolo UnBDoc nº 79100/2014 (Anexo 1).

Desenho experimental

O desenho experimental consistiu em dez dias de avaliação, ao qual os animais foram desafiados em dois testes comportamentais (teste de desempenho motor no Rotarod e teste de comportamento rotatório induzido por apomorfina) e eutanasiados por perfusão transcardiana no décimo segundo dia. O primeiro dia foi considerado como o dia de lesão hemiparkinsoniana por 6-OHDA, através da injeção unilateral da neurotoxina por via intraestriatal. A occidantalina-1202 foi administrada por via subcutânea, seguindo as doses de 8, 4 e 2 mg/kg, durante nove dias do experimento, sendo a primeira administração uma hora após a injeção da 6-OHDA e as próximas administrações sempre entre os horários de 8-10 horas da manhã (Figura 3).

Além dos modelos comportamentais, também foi realizada uma avaliação utilizando imuno-histoquímica, com o objetivo de quantificar os neurônios DA presentes na região da SNpc dos camundongos. A imuno-histoquímica foi realizada com cortes coronais dos encéfalos dos animais (50 µm de espessura) e a quantificação dos neurônios que expressavam a TH no SNpc teve o objetivo de identificar se o peptídeo occidantalina-1202 foi capaz de preservar essas células.

Todos os animais usados nos seguintes experimentos foram submetidos a um teste de triagem para seleção e alocação aleatória nos grupos experimentais. Esse teste consistiu em um treinamento no aparelho Rotarod, em que os camundongos foram dispostos na barra giratória (velocidade constante de 20 RPM) por 5 minutos, com repetições de cinco vezes e com o mínimo de 5 minutos de descanso entre cada ciclo. No primeiro dia após o treinamento (Figura 3), os animais foram testados no Rotarod (Insight®, Brasil) e os que permaneceram no aparelho por 5 minutos foram selecionados e alocados aleatoriamente para um grupo experimental. Importante ressaltar que em todos os grupos, os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico estereotáxico ou para indução de hemiparkinsonismo pela neurotoxina 6-OHDA ou injetados com a solução veículo (solução salina 0,9% e ácido ascórbico 0,2%).

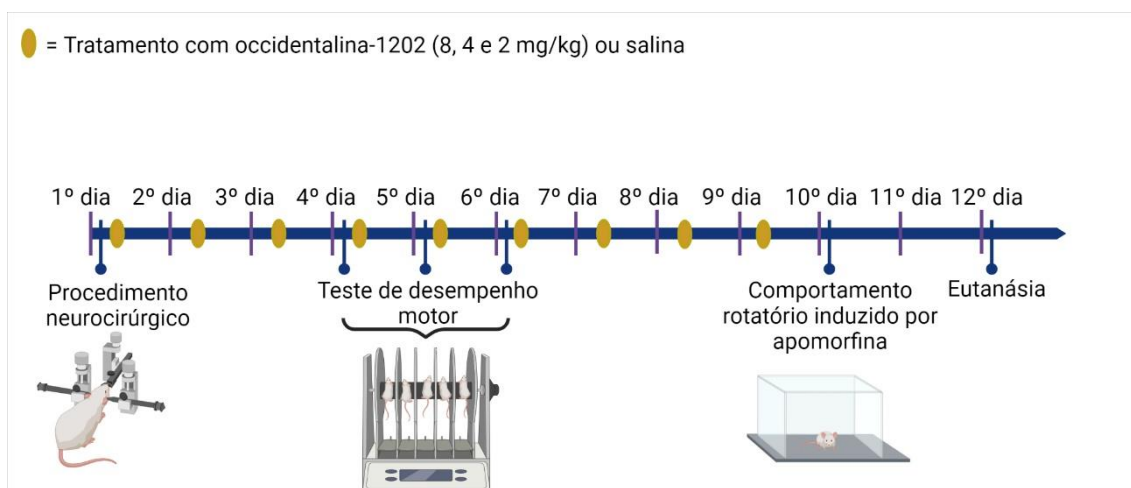


Figura 3: Representação esquemática do protocolo experimental realizado com os animais (camundongos machos), desde os ensaios comportamentais até o dia de eutanásia.

Determinação dos grupos experimentais

Três grupos experimentais foram separados para o presente estudo: grupo controle negativo, chamado de grupo 6-OHDA, em que os animais receberam a infusão unilateral de 6-OHDA (40 $\mu\text{g}/\text{animal}$, solubilizada em solução veículo: solução salina NaCl 0,9% e ácido ascórbico 0,2%) por via intraestriatal (4 μL) no lado esquerdo e foram tratados com 100 μL da solução salina (NaCl 0,9%) por via subcutânea (s.c); grupo SHAM, que recebeu a infusão unilateral de solução veículo (solução salina NaCl 0,9% e ácido ascórbico 0,2%) por via intraestriatal (4 μL) no lado esquerdo e foram tratados com 100 μL da solução salina (NaCl 0,9%) por via s.c; grupo tratado com o peptídeo occidentalina-1202, que recebeu a infusão da 6-OHDA (40 $\mu\text{g}/\text{animal}$, solubilizada em solução veículo: solução salina NaCl 0,9% e ácido ascórbico 0,2%) por via intraestriatal (4 μL) no lado esquerdo e foram tratados com o peptídeo nas doses de 8, 4 e 2 mg/kg de animal por via s.c (Tabela 1). Cada animal recebeu uma solução total de 100 μL por via s.c relativa a cada dose do peptídeo aplicada. As doses foram selecionadas com base em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Neurofarmacologia da Universidade de Brasília (Carneiro, 2013).

Tabela 1: Representação dos grupos experimentais aplicados no trabalho

Grupos experimentais	Administração		Nº de animais vivos até o fim dos experimentos/Nº total de animais (valor de sobrevivência em porcentagem)	
	Intraestriatal	Subcutânea		
6-OHDA	Solução 6-OHDA (40 µg/animal, solubilizada em solução salina NaCl 0,9% e ácido ascórbico 0,2%)	Solução salina (NaCl 0,9%)	6/9 (66,7%)	
SHAM	Solução veículo: salina (NaCl 0,9%) e ácido ascórbico 0,2%	Solução salina (NaCl 0,9%)	4/4 (100%)	
occidentalina-1202	2 mg/kg	Solução 6-OHDA (40 µg/animal, solubilizada em solução salina NaCl 0,9% e ácido ascórbico 0,2%)	Solução peptídica solubilizada em salina (NaCl 0,9%) e 20% de DMSO	9/11 (81,8%)
	4 mg/kg	Solução 6-OHDA (40 µg/animal, solubilizada em solução salina NaCl 0,9% e ácido ascórbico 0,2%)	Solução peptídica solubilizada em salina (NaCl 0,9%) e 20% de DMSO	7/8 (87,5%)
	8 mg/kg	Solução 6-OHDA (40 µg/animal, solubilizada em solução salina NaCl 0,9% e ácido ascórbico 0,2%)	Solução peptídica solubilizada em salina (NaCl 0,9%) e 20% de DMSO	7/7 (100%)

Procedimento cirúrgico estereotáxico

Para a avaliação do efeito antiparkinsoniano da Occidentalina-1202 *in vivo*, um procedimento neurocirúrgico foi estabelecido a fim de induzir o hemiparkinsonismo nos camundongos. O modelo selecionado foi o da infusão unilateral intraestriatal da neurotoxina 6-OHDA, conforme a descrição a seguir.

Os camundongos foram primeiramente anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de ketamina 10% (Dopalen, Ceva[®], 90 mg/kg, intraperitoneal – i.p.), cloridrato de xilazina 2% (Anasedan, Ceva[®], 10 mg/kg, i.p.) e Acepromazina 0,2% (Acepran, Vetnil[®], 2,5 mg/kg, i.p.). Após a verificação da sua insensibilidade a estímulos nociceptivos, os animais foram fixados no aparelho estereotáxico (Insight Equipamentos[®]), onde deu-se início ao procedimento cirúrgico. O primeiro passo foi realizar a assepsia com Álcool Iodado 0,1% da região superior da cabeça do camundongo e tricotomia dos pelos com o auxílio de uma tesoura cirúrgica. Em seguida, administrou-se por via subcutânea o cloridrato de lidocaína com hemitartarato de norepinefrina (Lidostesim, Densply[®], s.c), um anestésico local e vasoconstrictor, e, então, a pele da região superior da cabeça do camundongo foi removida para a exposição do crânio (Figura 4 A). Uma solução de água oxigenada foi aplicada sobre a região exposta do crânio, tanto para reforçar a assepsia do local, quanto para expor as suturas do crânio do camundongo. Em seguida, foram realizadas as medidas estereotáxicas necessárias para o correto posicionamento da agulha de injeção da 6-OHDA na região do estriado esquerdo, seguindo as coordenadas em relação ao ponto inicial, o Bregma: + 1 mm (antero-posterior), + 1,8 mm (meso-lateral) e – 3,5 mm (dorso-ventral) (Paxinos e Franklin 2004). Após a marcação do local de injeção, foi realizada uma perfuração na região com o uso de uma broca (Dremel[®]), por onde 4 µl da solução 6-OHDA (Sigma, Brasil, total de 40 µg/animal da base livre) ou veículo (solução salina NaCl 0,9% e ácido ascórbico 0,2%) foram diretamente infundidas na região do estriado esquerdo (Figura 4 B). Nessa etapa, foi utilizado um sistema de infusão, formado por um fio de polietileno acoplado a uma seringa de precisão (Hamilton[®]) de 10 µl e uma bomba de infusão (Insight[®], Brasil), com uma taxa de injeção de 0,5 µl/min. Após a infusão das soluções, a agulha foi mantida no local por quatro minutos para difusão do composto. Ao término do procedimento cirúrgico, um pedaço de esparadrapo Micropore foi colocado na região perfurada e o crânio exposto do animal foi revestida com o acrílico dental autopolimerizante para proteção. Os camundongos foram mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob as condições anteriormente relatadas. Após

a recuperação da anestesia e durante todo o protocolo experimental, os animais receberam soro glicosado 5% (Equipex[®]), por via i.p., além de ração pastosa e suplementação nutricional com Glicopan Gold (Vetnil[®]) por via oral, a fim de garantir a sobrevivência dos mais enfraquecidos pelo procedimento cirúrgico.

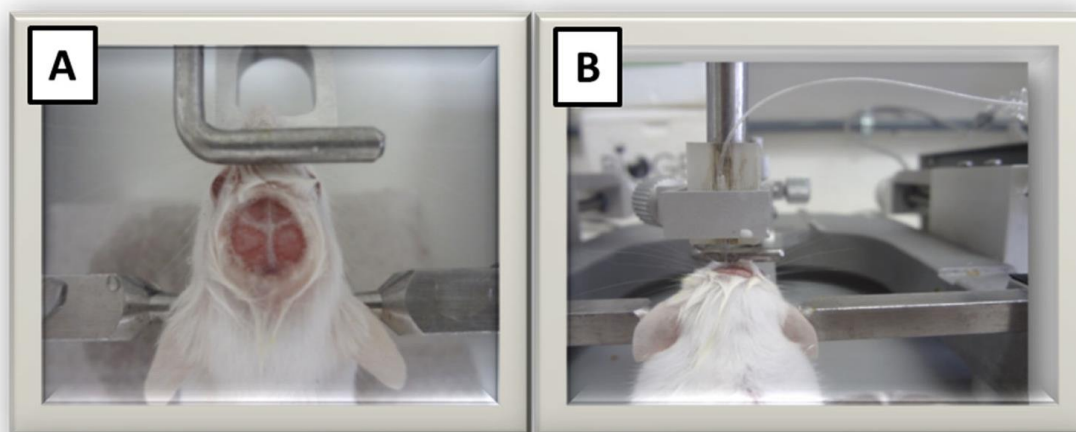


Figura 4: Procedimento neurocirúrgico. Em A: exposição do crânio e da linha do bregma. B: Lesão estriatal dopaminérgica com infusão de 40 $\mu\text{g}/4\mu\text{l}$ de 6-OHDA diretamente no Estriado esquerdo utilizando uma bomba de infusão com um fio de polietileno acoplado a uma seringa Hamilton de 10 μl (Biolchi, 2018).

Ensaio comportamentais

Dois modelos de avaliação comportamental foram selecionados para o seguinte trabalho: teste de desempenho motor sobre o aparelho Rotarod e teste de comportamento rotatório induzido pela injeção s.c de apomorfina. Cada teste comportamental será melhor descrito nos próximos tópicos.

Teste de desempenho motor utilizando o aparelho Rotarod

Este teste consiste na avaliação da coordenação e desempenho motor dos animais no aparelho Rotarod. O Rotarod consiste em uma barra metálica cilíndrica e giratória de 5 cm de diâmetro, com rotação constante de 20 RPM. Para tanto, quatro tempos foram considerados neste ensaio: 0, 72, 96 e 120 horas após a lesão (Figura 3). Sendo que o tempo 0 é considerado como o dia de lesão unilateral de 6-OHDA, em que para que os animais sejam selecionados para o estudo, eles devem permanecer 300 segundos sobre o Rotarod; os tempos de 72, 96 e 120 horas correspondem ao 4^o, 5^o e 6^o dias de experimento

respectivamente (Figura 3). No dia de cada avaliação, os animais foram colocados no aparelho e o tempo de latência de desequilíbrio e queda foram quantificados. Cada animal teve três tentativas na barra do Rotarod e uma média dos tempos foi quantificada, afim de se avaliar o desempenho motor dos animais.

A decisão em começar este teste comportamental 72 horas após a lesão induzida foi dada de forma a permitir um tempo de recuperação do animal após o procedimento cirúrgico. Foram dados também um período de 72 horas de descanso depois do último dia de ensaio de desempenho motor, de forma que o animal estivesse recuperado deste ensaio comportamental.

Teste de comportamento rotatório induzido pela injeção s.c de apomorfina

Neste modelo, os animais receberam uma injeção subcutânea do agonista dopaminérgico apomorfina (5 µg/animal - Sigma®). O volume de injeção é dado a partir do peso do animal. O teste possuiu um tempo de avaliação total de 20 minutos, em que, após a injeção, os animais foram colocados em uma arena de 30 cm de diâmetro por 5 minutos para a habituação e, em seguida, filmados por 15 minutos. A quantidade de giros contralaterais performada por cada animal foi quantificada dentro desses 15 minutos. Este ensaio foi realizado no décimo dia de experimento e teve como finalidade a determinação do grau da lesão hemiparkinsoniana induzida no animal.

Perfusão e histologia

A eutanásia dos animais foi realizada no décimo segundo dia. Para tanto, os camundongos foram anestesiados por via i.p. com tiopental sódico (240 mg/Kg de animal) e, em seguida, perfundidos por via transcardíaca com 10 ml de solução salina a NaCl 0,9% seguida de 10 ml de solução de formaldeído a 4%. Os encéfalos dos animais foram, então, extraídos e colocados em solução fixadora de formaldeído 4% por 24h. Após este período, os encéfalos foram colocados em solução de sacarose 30% por 48 horas. Os encéfalos foram, em seguida, seccionados horizontalmente a 50 µm de espessura utilizando-se um vibrátomo (KD-400 Vibration Microtome, Zhejiang Jinhua Kedi Instrumental). Os cortes coronais da região da SNpc foram selecionados de acordo com o atlas (Paxinos e Franklin 2004). Após a identificação, os cortes foram colhidos e

mergulhados em solução *anti-freezing* para a realização da marcação por imunofluorescência.

Imuno-histoquímica

Avaliação da viabilidade de neurônios reativos a tirosina hidroxilase

Para a quantificação de neurônios DA na região da SNpc dos camundongos, foi realizada a técnica de imuno-histoquímica com a marcação de anticorpos reativos contra a enzima TH. Sendo assim, foram utilizados um anticorpo primário policlonal contra TH produzidos em coelho (Abcam), em uma diluição de 1:1000, e um anticorpo secundário policlonal (Abcam) específico para o anticorpo primário, produzido em cabra contra IgG – H&L de coelho com o fluoróforo Alexa flúor-488, em uma diluição de 1:400.

O primeiro passo para a imuno-histoquímica foi a lavagem dos cortes coronais em solução tampão salina-fosfato (PBS) duas vezes por 10 minutos, seguida da permeabilização em solução PBS com 0,80 Triton X-100 por 1 hora. Em seguida, foram realizadas três lavagens com solução PBS e os cortes foram colocados em uma solução bloqueadora “Protein Block” (1% BSA, 10% leite desnatado, 0,3 M de glicina, 0,1% Tween 20) por 1 hora. Posteriormente, as fatias foram incubadas com o anticorpo primário a 4°C, sob agitação constante por 48 horas.

Após a incubação, os cortes foram novamente lavados com solução PBS e incubados novamente, porém agora com o anticorpo secundário, na concentração de 1:400 diluído em solução PBS + 1% BSA a temperatura ambiente e sobre agitação constante por 3 horas e no escuro. Por último, foram feitas três lavagens de 4 minutos cada, no escuro, seguida da montagem das lâminas com o Fluorescente Média DAPI (20 ml) (Sigma). Uma gota do DAPI foi colocada em cima de cada corte e deixado a temperatura ambiente por 5 minutos. As lamínulas foram colocadas em cima dos cortes e, em seguida, foram vedadas com esmalte incolor. Por fim, as lâminas estavam prontas para observação no microscópio de epifluorescência.

Análise por microscopia de epifluorescência

Os cortes obtidos pela técnica de imuno-histoquímica foram analisados utilizando-se um microscópio epifluorescente (Leica DM 2000), equipado com uma

câmera digital com filtros de excitação BP 480/40 (visualizado como verde; marcação anti-TH) e BP 340-380 (visualizado como azul; marcação para núcleos celulares). O programa ImageJ 1.48v (National Institute of Health- NIH) foi usado para quantificação manual dos neurônios reativos à marcação anti-TH. Os cortes foram analisados no local que corresponde à região da SNpc dos camundongos e com um aumento de 20X. Para a quantificação dos neurônios, foram considerados como neurônios DA viáveis as células coloradas em verde – citoplasma celular reativo a TH que apresentaram a emissão de coloração em verde - com núcleos que apresentam a coloração em azul – coloração DAPI (L. Li e Zhou 2013) (Figura 5).

Para a quantificação dos neurônios anti-TH, foram utilizados de 2-3 fatias cerebrais de cada grupo. A contagem se deu a partir da região do SNpc, contando cada neurônio DA viável para cada fatia cerebral presente na lâmina. Uma média de neurônios totais foi calculada considerando cada fatia.

Por se tratar de um modelo hemiparkinsoniano de 6-OHDA, apenas um hemisfério do encéfalo dos animais foi afetado pela neurotoxina, no caso o hemisfério esquerdo (região de injeção da 6-OHDA; lado ipsilateral). O hemisfério direito (lado contralateral), não afetado pela 6-OHDA, foi considerado como sadio. A importância dessa forma de análise é a possibilidade de usar o animal em estudo como o seu próprio controle. Dessa forma, os resultados de quantificação dos neurônios DA na SNpc foram analisados na proporção das células viáveis presentes na região lesada em relação ao lado sadio do corte, obtendo-se, assim, uma porcentagem total sobre os neurônios anti-TH remanescentes seguindo a seguinte fórmula:

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

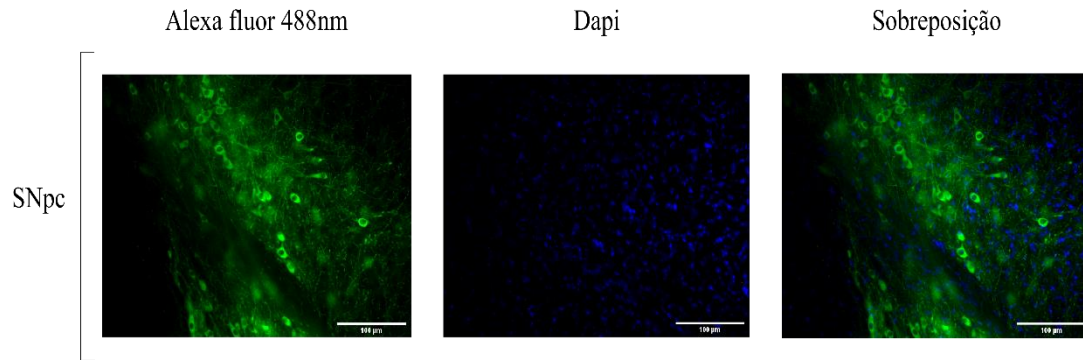


Figura 5: Imagem demonstrativa para quantificação de neurônios reativos a TH na região da SNpc com dupla marcação dos neurônios com citoplasmas em verde e núcleos em azul. Consideraram-se neurônios viáveis as células com citoplasmas bem definidos e que emitiam a fluorescência em verde (Alexa flúor-488) após marcação com anticorpo anti-TH e com núcleos com fluorescência azul, marcados a partir de um meio de montagem DAPI (Escala das imagens demonstrada em 100 µm).

Análise estatística

A análise estatística dos dados experimentais obtidos foi realizada por meio do software GraphPad Prism[®] 9.0 (San Diego, CA, USA). Para valores estatisticamente significantes foi considerado $p < 0,05$.

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

Os resultados com distribuição normal e com duas variáveis foram submetidos ao teste de análise de variância de medidas repetitivas de duas vias (two-way ANOVA), seguido do teste de Tukey

Os testes de comparação de curva de sobrevivência dos grupos usados foram os de Log-rank (Mantel-Cox), Logrank para tendência e Gehan-Breslow-Wilcoxon.

Resultados

Análise de sequência e pureza do peptídeo occidentalina-1202

Como destacado anteriormente, a occidentalina-1202 foi sintetizada pela empresa Biointech® e sua análise de qualidade foi atestado pelo Laboratório de Neurofarmacologia da UnB, pelo técnico de laboratório Adolfo Carlos Barros de Souza, para a correta identificação de sua massa molecular, pureza e sequência.

Dessa forma, foi utilizada a técnica de espectrometria de massa por MALDI-TOF. Os dados mostraram uma massa $[M + Na]^+ = 1225,52$ e $[M + K]^+ 1243,45$ Da e um nível de pureza $> 95\%$, como já era esperado (Figura 6). Além disso, também foram identificadas a sequência da occidentalina-1202, sendo essa composta por 9 resíduos de aminoácidos correspondente à: Glu-Gln-Tyr-Met-Val-Ala-Phe-Trp-Met-NH₂.

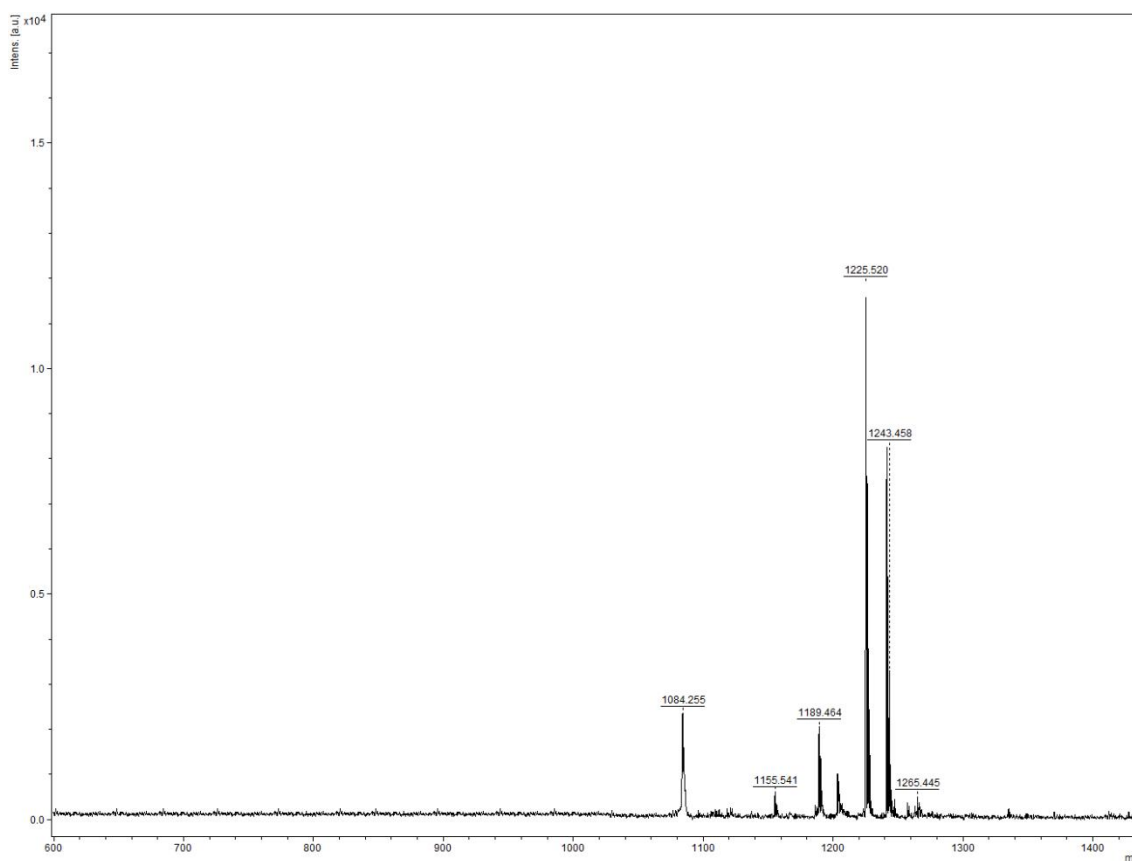


Figura 6: Espectro de massa da occidentalina-1202, identificando duas massas equivalentes para a occidentalina-1202 $[M + Na]^+ = 1225,52$ e $[M + K]^+ = 1243,45$ Da.

Teste de desempenho motor sobre o aparelho Rotarod

Primeiramente, destaca-se que o grupo SHAM (n = 4) ficou 100% do tempo (300 segundos) no aparelho Rotarod e foi significativamente diferente em relação ao grupo lesionado e não tratado (grupo 6-OHDA; n = 8), o que é importante para validar o uso

deste teste para análise de desempenho motor (Figura 7). O teste estatístico usado foi o ANOVA de duas vias seguido do teste de múltipla comparação Tukey. Foi identificadas diferenças significativas em relação ao tempo [$F(2, 801, 92,44) = 28,31; p < 0,001$] e entre os grupos experimentais (tratamento com peptídeo ou salina) aplicados neste estudo [$F(4, 33) = 3,949; p = 0,01$]. Também foram identificadas diferenças significativas na interação tempo x tratamento [$F(12, 99) = 2,378; p = 0,0097$].

Um resultado interessante que obtivemos com este modelo foi a melhora progressiva observada com o grupo tratado com occidentalina-1202 na maior dose (8 mg/kg; n = 7). Observa-se que no primeiro tempo de análise de desempenho motor, 72 horas, os animais ficaram em média 38,4% do tempo total no Rotarod (média de permanência no Rotarod de 115,2 segundos), próxima aos outros grupos e sendo significativamente diferente ao grupo SHAM ($p < 0,05$). No entanto, nos tempos de análise seguintes foi possível observar uma melhora progressiva no desempenho motor dos animais, com o grupo tratado com a maior dose não sendo significativamente diferente com relação ao grupo SHAM tanto em 96 horas, permanecendo 58,1% do tempo no Rotarod (média de 174,3 segundos), quanto em 120 horas, permanecendo 71,8% do tempo no Rotarod (média de 215,4 segundos), após a lesão. O teste de uma via de ANOVA seguido pelo Tukey revelaram ainda que no tempo de 120 horas, os animais tratados com 8 mg/kg foram significativamente diferentes do grupo 6-OHDA [$F(4, 35) = 4,894; p = 0,0031$].

Este comportamento não foi observado com as outras doses de occidentalina-1202 aplicadas. Na menor dose (2 mg/kg; n = 11), os animais mostraram uma melhora motora no tempo de 96 horas após a lesão, com uma permanência de 60,7% do tempo total (média de 182,1 segundos no Rotarod), não sendo significativamente diferente do grupo SHAM. Porém, no tempo de 120 horas os animais tiveram uma queda no desempenho motor, permanecendo em média 40,6% do tempo no Rotarod (média aproximada de 121,8 segundos), não tendo diferença significativa com o grupo 6-OHDA e sendo diferente significativamente do grupo SHAM ($p < 0,01$). Já na dose intermediária (4 mg/kg; n = 8), os animais não obtiveram melhora motora, apresentando diferenças significativas com o grupo SHAM em todos os tempos avaliados (Figura 7).

No tempo de 96 horas, os animais tratados com as doses de 2 e 4 mg/kg do peptídeo obtiveram uma média de tempo de permanência igual a 182,1 e 156,8 segundos respectivamente, enquanto o grupo 6-OHDA teve uma média aproximada de 74,7

segundos. Já no tempo de 120 horas, a média de tempo caiu para os animais tratados com 2 e 4 mg/kg de occidentalina-1202, correspondendo à aproximadamente 121,8 e 126,2 segundos respectivamente, enquanto os animais do grupo 6-OHDA caíram para uma média de 61 segundos

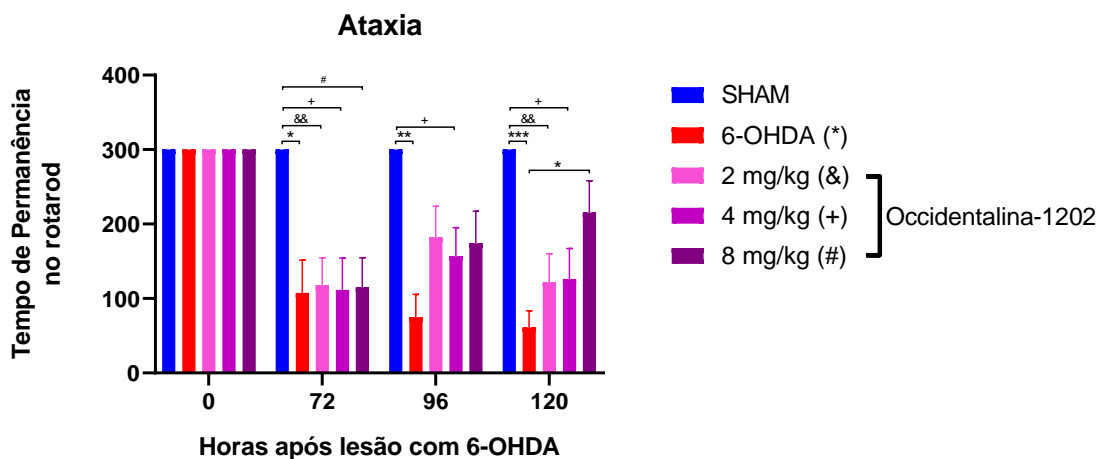


Figura 7: Teste de desempenho motor sobre o aparelho Rotarod. Tempo em horas após lesão com 6-OHDA. Os animais foram avaliados em quatro tempos diferentes: 0, 72, 96 e 120 horas após a lesão com 6-OHDA. Grupos controles: 6-OHDA (n = 8) e grupo SHAM (n = 4). Grupos tratados com occidentalina-1202: 2 mg/kg (n = 11), 4 mg/kg (n = 8), 8 mg/kg (n = 7). Diferenças significativas * (p < 0,05), ** (p < 0,01) e *** (p < 0,001) em relação ao grupo controle 6-OHDA; diferenças significativas && (p < 0,01) em relação ao grupo tratado com 2 mg/kg de occidentalina-1202; diferenças significativas + (p < 0,05) em relação ao grupo tratado com 4 mg/kg de occidentalina-1202; diferenças significativas # (p < 0,05) em relação ao grupo tratado com 8 mg/kg de occidentalina-1202 {ANOVA de duas vias, diferenças significativas representadas ao longo do tempo: [F (2,801, 92,44) = 28,31; p < 0,001]; entre os tratamentos aplicados: [F (4, 33) = 3,949; p = 0,01]; interação tempo x tratamentos aplicados [F (12, 99) = 2,378; p = 0,0097]}; {ANOVA de uma via, diferença significativa entre os grupos no tempo de 120 horas: [F (4, 35) = 4,894; p = 0,0031]}.

Teste de comportamento rotatório induzido pela injeção s.c de apomorfina

Os resultados mostraram que houve uma diferença significativa entre o grupo SHAM (n = 4) e o grupo 6-OHDA (n = 6), já esperado para este modelo (p < 0,05). O teste estatístico usado foi o de ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste teste de múltipla comparação de Tukey [F (4, 28) = 2; p = 0,0483]. No entanto, não foram observadas reduções significativas na média de giros contralaterais dos animais tratados nas três doses da occidentalina-1202 (2, 4 e 8 mg/kg). Os animais do grupo 6-OHDA

tiveram uma média de aproximada de 155 giros, enquanto os animais tratados com 2 e 8 mg/kg obtiveram médias aproximadas de 108 e 93 giros (menores médias de giros contralaterais identificadas). Os animais tratados com a dose de 4 mg/kg tiveram uma média igual a 136 giros aproximadamente. Portanto, para este ensaio comportamental, não foi possível observar um efeito antiparkinsoniano significativos do peptídeo (Figura 8).

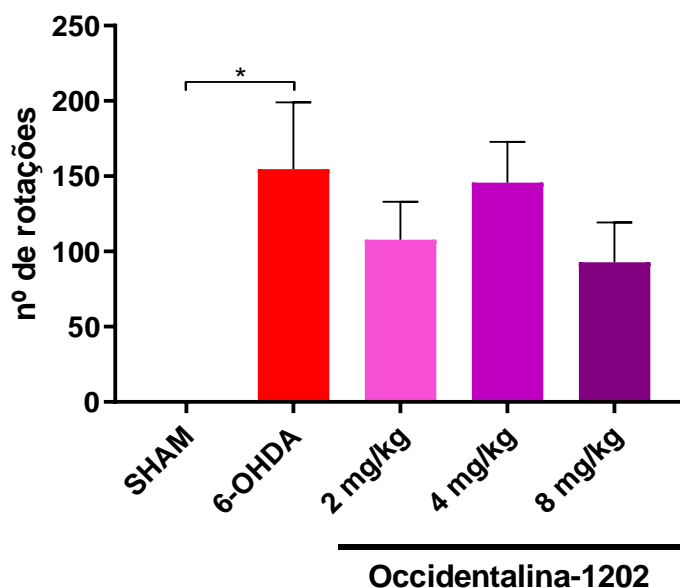


Figura 8: Análise do comportamento rotatório induzido por apomorfina (agonista dopaminérgico) injetado por via s.c. (5 ug/animal) em camundongos previamente injuriados com 6-OHDA. Grupos controles: 6-OHDA (n = 6) e SHAM (n = 4). Grupo occidentalina-1202: 2 mg/kg (n = 9), 4 mg/kg (n = 7), 8 mg/kg (n = 7). Grupos com diferenças significativas * ($p < 0,05$) {One-way ANOVA: $[F(4, 28) = 2; p = 0,0483]$ }.

Sobrevivência dos grupos experimentais

Os testes de comparação de curva de sobrevivência dos grupos não mostraram diferenças significativas entre os grupos [Log-rank (Mantel-Cox), Logrank para tendência e Gehan-Breslow-Wilcoxon]. Observou-se que a taxa de sobrevivência para os animais do grupo 6-OHDA foi de 66,7%. Já para o grupo tratado com occidentalina-1202 na dose de 2 mg/kg, a sobrevivência dos animais girou em torno de 81,8%, enquanto o grupo tratado com a dose de 4 mg/kg, a sobrevivência ficou em 87,5%. Os animais dos grupos SHAM e tratados com 8 mg/kg de occidentalina-1202 não tiveram mortes, apresentando taxa de sobrevivência de 100% (Figura 9).

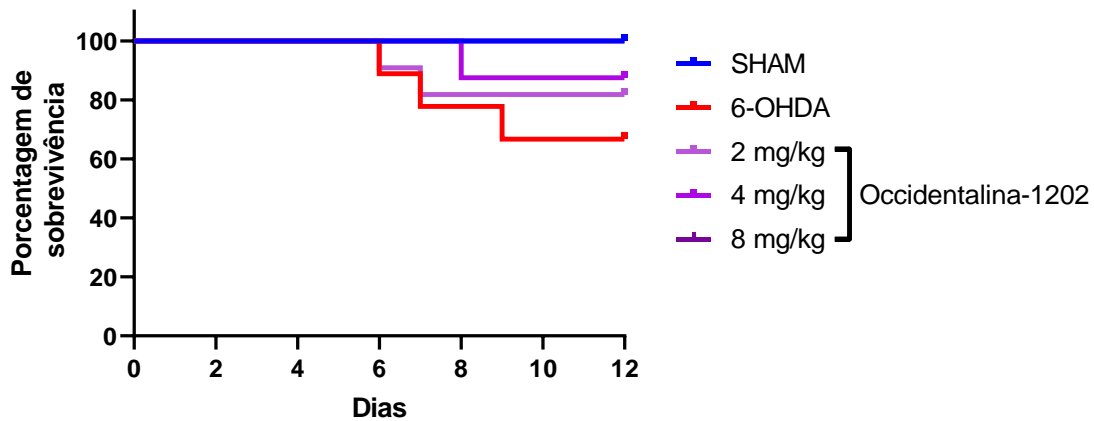


Figura 9: Curva de sobrevivência dos animais em cada grupo experimental aplicados. Grupos controles 6-OHDA (n = 9) e SHAM (n = 4). Grupo occidentalina-1202 (2 mg/kg n = 11), 4 mg/kg (n = 8), 8 mg/kg (n = 7). Log-rank p = 0,3733; Chi square = 4,250.

Quantificação de neurônios TH+ na SNpc

No caso, começando pelos dois grupos controles empregados neste estudo, grupos SHAM e 6-OHDA, foi identificado uma preservação média de mais de 100% dos neurônios para o grupo SHAM, resultado já esperado visto que não houve lesão induzida, enquanto o grupo 6-OHDA teve preservação aproximada de 44,3% das células. Os dois grupos foram significativamente diferentes entre si, como também já esperado (Figura 11). O teste estatístico usado foi o de ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste teste de múltipla comparação de Tukey [F (4, 27) = 32,10; p < 0,001].

Com relação as diferentes doses de occidentalina-1202 aplicadas, os dados mostraram que a dose de 2 mg/kg teve um bom desempenho na proteção dos neurônios DA, preservando entre 73% das células e sendo significativamente diferente do grupo 6-OHDA. A dose de 8 mg/kg também efetuou uma boa proteção dos neurônios, preservando aproximadamente 60,7% das células. O teste T não pareado mostrou que houve diferença significativa entre os animais do grupo 6-OHDA e os animais tratados com a maior dose da occidentalina-1202 (t = 2,434, df = 11; p = 0,0332). Por último, a dose intermediária foi a que menos obteve resultados positivos, tendo uma preservação média aproximada de 44% e não sendo significativamente diferente do grupo 6-OHDA.

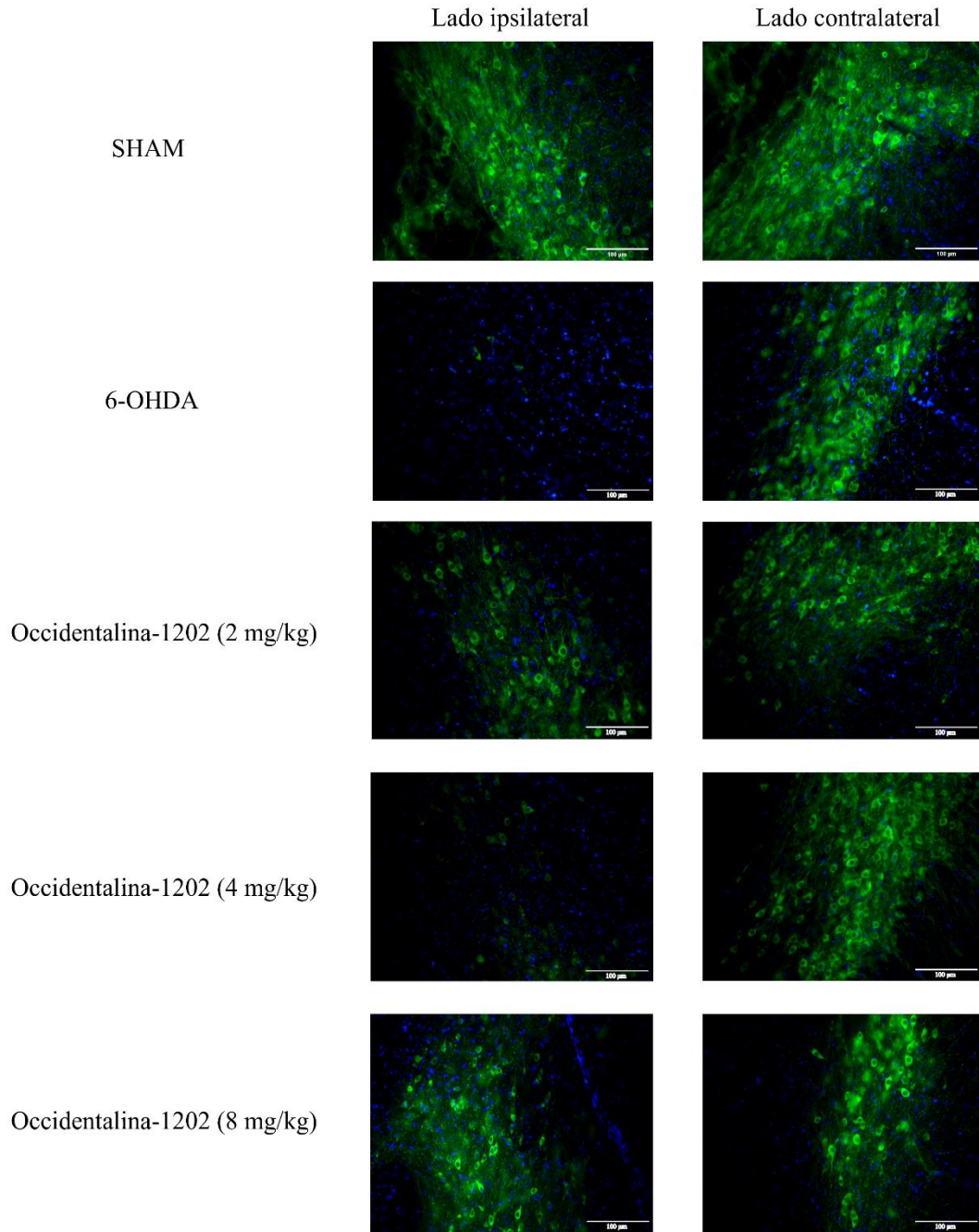


Figura 10: Representação das imunofluorescências realizadas para cada grupo experimental usado neste trabalho. Dupla marcação dos neurônios DA com citoplasmas em verde e núcleos em azul. Consideraram-se neurônios viáveis as células com citoplasmas bem definidos e que emitiam a fluorescência em verde (Alexa fluor-488) após marcação com anticorpo anti-TH e com núcleos com fluorescência azul, marcados a partir de um meio de montagem DAPI (Escala das imagens representada em 100 μm).

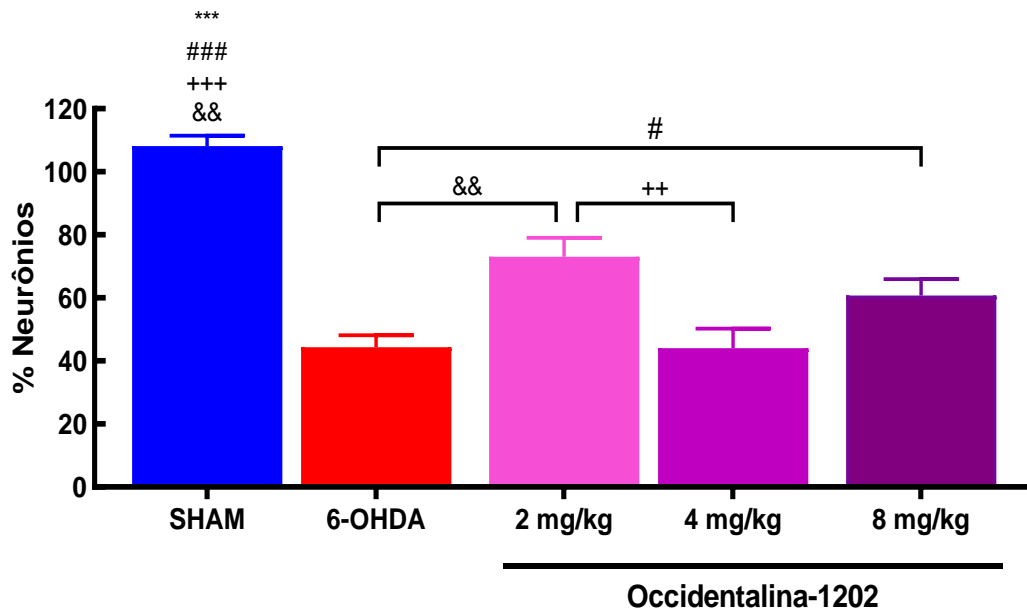


Figura 11: Determinação de porcentagem de neurônios DA viáveis imunoreativos a TH em fatias cerebrais da região SNpc de camundongos. Grupos controles: 6-OHDA (n = 6) e SHAM (n = 4). Grupos tratados com occidentalina-1202 nas doses de 2 mg/kg (n = 9), 4 mg/kg (n = 7) e 8 mg/kg (n = 7). Diferenças significativas entre o grupo 6-OHDA representado em ** (p < 0,01) e *** (p < 0,001), tratado com occidentalina-1202 nas doses de 2, 4 e 8 mg/kg representados em && (p < 0,01), +++ (p < 0,001) e ### (p < 0,001), respectivamente {One-way ANOVA seguido do pós-teste de múltipla comparação de Tukey [F (4, 27) = 32,10; p < 0,001]}. Teste t não pareado mostrou diferença significativa # (p < 0,05) entre o grupo tratado com occidentalina-1202 na dose de 8 mg/kg e o grupo 6-OHDA (t = 2,434, df = 11; p = 0,0332).

Discussão

Doenças neurodegenerativas entram no universo de desordens que mais impactam a qualidade de vida de idosos. A falta de uma etiologia clara que definam essas doenças, em especial a DP – desordem neurodegenerativa de crescimento mais acentuado –, impõe a fragilidade atual em lidar com os seus tratamentos (Feigin et al. 2017). De fato, a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos para a DP se torna imperativo e imprescindível. Leva-se ainda mais em conta a carência de medicamentos eficazes que impeçam a sua progressão, tendo as terapias atuais maior foco sobre o alívio sintomático. Destaca-se também que pouco progresso vem sendo feito com relação à novas terapias para DP, por exemplo, com novos fármacos aprovados tendo foco sobre novas formulações da L-dopa (principal tratamento sintomático) ou terapias de sinais relativos a grupos específicos de pacientes – pimavaserin para o tratamento de alucinações e droxidopa para tonturas.

Dessa forma, tendo em vista justamente a falta de medicamentos eficazes para o tratamento de doenças neurodegenerativas, a disponibilidade de alternativas, como peptídeos terapêuticos, se torna uma via interessante de se explorar. Em especial, peptídeos derivados de venenos e peçonhas possuem a capacidade de mimetizar processos moleculares e fisiológicos intrínsecos celulares (Lau e Dunn 2018). Para tanto, a aplicação destes compostos possuem um alto potencial como alternativas farmacológicas para com estas desordens, em especial a DP (Amaral et al. 2019).

Trazendo à tona a demanda por novas terapias antiparkinsonianas e a disponibilidade farmacológica que peptídeos derivados da peçonha de vespas apresentam. O presente trabalho objetivou explorar uma alternativa terapêutica de forma que vise impedir a progressão de morte neuronal bem como desempenhar uma melhora sobre os sinais motores em modelo animal parkinsoniano.

Nesse sentido, o seguinte trabalho teve como propósito identificar o efeito antiparkinsoniano da occidentalina-1202 no modelo de lesão unilateral induzida pela neurotoxina 6-OHDA em camundongos. Observou-se que o peptídeo teve um efeito positivo sobre o desempenho motor dos animais, principalmente na dose de 8 mg/kg, maior dose avaliada, em que os camundongos obtiveram uma melhora motora progressiva. Além disso, o teste de imunofluorescência mostrou um promissor efeito neuroprotetor para a occidentalina-1202 em contrapartida aos dados observados no teste de rotação induzida pela apomorfina. Neste ensaio, foi possível identificar a preservação

entre 60,7% dos neurônios DA na SNpc na dose 8 mg/kg, o que reforça o potencial efeito terapêutico da occidentalina-1202, principalmente para desordens neurológicas.

Além disso, um outro achado interessante para este estudo foi que o grupo tratado com a dose de 8 mg/kg promoveu uma sobrevivência de 100% dos animais assim como o grupo SHAM. Já os camundongos tratados com a dose intermediária e menor dose tiveram uma sobrevivência de 87,5% e 81,8%. Os animais do grupo 6-OHDA tiveram a menor taxa de sobrevivência, sendo esta de aproximadamente 66,7%.

Tendo em vista o potencial na aplicação de venenos e peçonhas de animais bem como de seus derivados como alternativas farmacológicas para a DP, diversos estudos descrevem a capacidade dessas moléculas em atuar no combate à progressão dessa doença (Amaral et al. 2019). No âmbito da aplicação de peçonhas brutas, um composto de interesse é a peçonha bruta da abelha *Apis mellifera*. O conjunto de moléculas bioativas presente na sua composição foi identificada como potencial ação neuroprotetora e modulatória da neuroinflamação (Monge-Fuentes et al. 2015; Amaral et al. 2019). Em estudos pré-clínicos *in vivo* com aplicação de MPTP foi possível observar efeitos de neuroproteção com aumento de infiltração de células Treg e inibição da ativação microglial (Chung et al. 2012), além de também atenuação da ativação de astrócitos (Kim et al. 2016). No entanto, ao se transferir para os estudos clínicos com a peçonha bruta da *A. mellifera*, os resultados não foram capazes de demonstrar melhoras nos sinais motores ao comparar os grupos tratados e grupo placebo (Hartmann et al. 2016). Em um segundo estudo, pacientes com DP foram divididos em grupos tratados com a peçonha bruta aplicada com acupuntura ou somente acupuntura. Em ambos os grupos foi possível observar melhora motora nos pacientes, porém, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos com a peçonha bruta aplicada com acupuntura e somente acupuntura (Cho et al. 2012).

Em um direcionamento mais específico, a aplicação de peptídeos derivados de venenos ou peçonhas se torna uma alternativa mais viável. Como destacado anteriormente, o interesse farmacológico dessas moléculas advém de sua alta especificidade para com receptores celulares além de mimetizar atividades fisiológicas e moleculares intrínsecas de vias celulares naturais (Lau e Dunn 2018). De fato, esse interesse na capacidade farmacológica desses peptídeos traz a possibilidade do seu uso como protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos. Dentre os mais famosos fármacos já desenvolvidos, está o captopril, aprovado pelo FDA no início dos

anos de 1980 e com atividade anti-hipertensiva capaz de inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA) (Smith e Vane 2003). O captopril foi um medicamento criado a partir de um peptídeo isolado da peçonha da serpente brasileira *Bothrops jararaca* (Smith e Vane 2003; Bryan 2009).

Outro peptídeo derivado de toxinas com bastante interesse farmacológico é o Exendin-4. O Exendin-4 é um peptídeo de 39 resíduos de aminoácidos e isolado do veneno do lagarto *Heloderma suspetum*, o monstro de gila (Eng et al. 1992). O interesse nesse composto vem do seu potencial como tratamento para diabetes tipo 2, em que identificou-se uma atividade insulinoatrófica devido a sua capacidade em se ligar aos receptores GLP-1 (*Glucagon like peptide 1*) em células pancreáticas do tipo β e aumentar o AMPc intracelular (Goke et al. 1993). A partir desses dados, diversos peptídeos análogos com base no Exendin-4 foram desenvolvidos, dentre eles estão o exenatide, liraglutide, lixisenatide, and dulaglutide.

Esta capacidade do Exendin-4 em se ligar aos receptores GLP-1 é o que traz o alto interesse farmacológico desse composto. Estes receptores, além de expressos em células pancreáticas do tipo β , também são altamente encontrados em neurônios e células da glia de diferentes regiões do encéfalo, incluindo estriado e SNpc. A ativação deste receptor nos neurônios pode desencadear uma série de efeitos neuroprotetores, o que atrai o interesse deste peptídeo para sua aplicação como tratamento de distúrbios neurológicos (Athauda e Foltynie 2016). Dentre os efeitos observados para o Exendin-4 e seus análogos, incluem-se controle da neuroinflamação (inibição da ativação microglial), ativação da Akt, neurogênese, proteção contra estresse oxidativo, inibição das vias de apoptose e aumento da plasticidade sináptica (Athauda e Foltynie 2016).

No caso, o peptídeo Exendin-4 vem sendo amplamente estudado em estudos pré-clínicos em modelos *in vivo* da DP (ratos, camundongos e primatas não humanos). Em modelos de neurodegeneração da SNpc induzidas por toxinas (MPTP, 6-OHDA e LPS), observou-se que o tratamento com o seu análogo, o exenatide, induziu a preservação dos neurônios DA (reativos a TH) da SNpc, reestabelecendo os níveis de dopamina no encéfalo e melhorando os quadros comportamentais e motores dos animais (Harkavyi et al. 2008; Bertilsson et al. 2008; Y. Li et al. 2009; S. Kim et al. 2009). Harkavyi e colaboradores (2008) observaram que a administração de exendin-4 duas vezes ao dia por via intraperitoneal (0,1 e 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) impediu a morte de neurônios DA na SNpc no modelo de lesão unilateral de 6-OHDA em camundongos (Harkavyi et al. 2008), enquanto

Bertilsson e colaboradores (2008), aplicando exendin-4 duas vezes ao dia (0,1 µg/kg) no mesmo modelo, obtiveram os mesmos resultados de preservação dos neurônios DA (Bertilsson et al. 2008).

O Exendin-4 também já foi aplicado em estudos clínicos. Foi observado melhora no desempenho motor em pacientes com DP moderada e tratados com Exendin-4 duas vezes ao dia após 12 meses de tratamento (Aviles-Olmos et al. 2013), com este efeito se mantendo ao longo dos 12 meses seguintes (Aviles-Olmos et al. 2015). Em um segundo estudo clínico, pacientes tratados com injeções semanais de Exendin-4 por 48 semanas, seguido por um período sem tratamento de 12 semanas, também obtiveram melhoras motoras (Athauda et al. 2017).

Comparando-se o presente trabalho com estudos realizados com o exendin-4, pode-se observar que ambos os peptídeos desempenharam efeitos antiparkinsonianos promissores. A administração diária da occidentalina-1202 na sua maior dose (8 mg/kg s.c), uma vez ao dia, foi capaz de melhorar o desempenho motor dos animais e preservar os neurônios DA na SNpc, em contrapartida às duas administrações realizadas com o exendin-4 (Harkavyi et al. 2008; Bertilsson et al. 2008). Importante ressaltar que a meia-vida da occidentalina-1202 foi identificada com o valor aproximado de 6 horas em soro sanguíneo de camundongos *Swiss* diluído em salina (25%) (Schwartz 2020), em contraste a meia-vida do exendin-4 que foi calculado em torno de 2-2,4 horas (Yun et al. 2018; Tang et al. 2018). Além disso, comparando-se as doses aplicadas entre a occidentalina-1202 e o exendin-4, a occidentalina-1202 precisou de uma dose mais elevada para desempenhar o seu efeito antiparkinsoniano. Porém, pode-se considerar que o aumento de dose não tenha interferências fisiológicas prejudiciais, visto que, em estudos anteriores, a occidentalina-1202 foi identificada como peptídeo de boa tolerabilidade mesmo em doses elevadas (Mortari 2007). Considera-se também que a occidentalina-1202 é um peptídeo com uma sequência menor em comparação ao exendin-4 (9 resíduos de aminoácidos x 39 resíduos de aminoácidos, respectivamente), além de não apresentar modificações pós-traducionais complexas (estrutura linear simples). Esse fato tem uma importância enorme sobre o seu valor de produção, o que a torna facilmente sintetizável com um custo menor e, por consequência, de mais fácil acesso para a população.

Um outro peptídeo que já foi estudado para o tratamento da DP é a neurovespina, um dos análogos sintéticos da occidentalina-1202. Esse peptídeo mostrou resultados neuroprotetores promissores em modelo hemiparkinsoniano de 6-OHDA em

camundongos. No caso, Campos (2016) observou que a neurovespina foi capaz de proteger os neurônios DA na SNpc, atingindo uma proteção média aproximada de 60%, e melhorar o desempenho motor dos animais tratados com o peptídeo na dose de 4 mg/kg por via intraperitoneal (Campos, 2016). Subsequentemente, foi identificado que um dos potenciais mecanismos de ação da neurovespina está atrelado com o bloqueio de correntes de cálcio em canais do tipo 1.2 ($Ca_v1.2$) (Campos, 2020). Esse último resultado tem uma grande importância sobre os estudos de efeito neuroprotetor com a occidentalina-1202, visto que ambos peptídeos são análogos e também demonstraram efeitos promissores em modelos animais de crises epiléticas (Carneiro, 2013). Vale ressaltar que em ensaios de dinâmica molecular, a occidentalina-1202 também mostrou afinidade com receptores do tipo kainato (dados não publicados).

Comparando-se os dois estudos, apesar de ambos os peptídeos desempenharem um promissor efeito antiparkinsoniano e neuroprotetor, a dose mais eficaz observada no estudo de Campos (2016) para a neurovespina foi de 4 mg/kg, enquanto essa dose não desempenhou o mesmo efeito para a occidentalina-1202, não sendo capaz de melhorar o comportamento motor dos animais e protegendo apenas 44% dos neurônios. Além disso, um ponto importante foi que no estudo realizado com a neurovespina, foram realizadas 3 aplicações do peptídeo ao longo de 21 dias de experimento, enquanto a occidentalina-1202 foi aplicada diariamente ao longo de 9 dias. Portanto, pode-se considerar que a neurovespina tenha um efeito antiparkinsoniano mais acentuado em comparação à occidentalina-1202, já que precisou de uma dose menor, com menos frequências de administração ao longo do estudo, para desempenhar a proteção dos neurônios DA na SNpc e melhora motora dos animais no mesmo modelo. Esta diferença é compreensível visto que a neurovespina foi sintetizada com base na occidentalina-1202, afim de melhorar parâmetros de seus efeitos farmacológicos (Carneiro 2013; Campos 2016)

Ainda assim, levando em conta a similaridade entre ambos os peptídeos, futuros estudos que visem identificar um mecanismo de ação para a occidentalina-1202, podem ser direcionados para o potencial bloqueio de canais de cálcio, principalmente com os canais do tipo $Ca_v1.3$. Esse tipo de canal, como abordado anteriormente, é bastante presente nos neurônios DA na SNpc e estão intrinsecamente relacionados com a questão de desregulação da homeostase do cálcio e vulnerabilidade neuronal encontrada na DP (Chan et al. 2009).

De fato, bloqueadores de canais de cálcio possuem potencial como agentes neuroprotetores, como é o caso da isradipina, um bloqueador de canais de cálcio do tipo L seletivo para os canais $Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$ e $Ca_v1.3$. A isradipina teve ação protetora sobre os neurônios DA em modelo parkinsoniano de MPTP, reduzindo o estresse oxidativo induzido pelo estresse mitocondrial (Chan et al. 2007; Guzman et al. 2010). Dessa forma, baseando-se sobre a atividade da neurovespina como bloqueadora de canais de cálcio, a identificação do mecanismo de ação da occidentalina-1202 seguindo esta linha é de bastante interesse, abrindo mais ainda a possibilidade de seu uso para o tratamento de desordens neurológicas como DP e epilepsia (Mortari 2007).

Por certo, ressaltando-se a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos para doenças neurodegenerativas, em especial a DP, a identificação de potenciais tratamentos passam pelos estudos pré-clínicos em modelos *in vivo*. Para tanto, existem os modelos de mutações gênicas, que estão envolvidos com formas familiares da DP (mutações sobre o gene SNCA, por exemplo), e modelos de indução parkinsoniana a partir da injeção de neurotoxinas (6-OHDA e MPTP) (Koprach et al. 2017; Dawson et al. 2018). Dentre as características gerais destes modelos, cada um visa recapitular os sinais gerais, bem como a neuropatologia de perda de neurônios DA na SNpc na DP, com alguns com mais sucesso que outros. No geral, apesar de alguns dos modelos de mutações gênicas não conseguirem recapitular tão bem a neurodegeneração observada na doença, eles são aplicados de forma a se compreender melhor a sua fisiopatologia (para revisão Koprach et al. 2017).

Já os modelos com aplicação de neurotoxinas possuem a vantagem de induzir uma neurodegeneração massiva da região da SNpc, com uma recapitulação mais assertiva sobre os sinais motores da doença. Em contrapartida, uma das principais desvantagens sobre estes modelos é a falta de agregados de alfa-sinucleína, uma das características principais da DP. Dentre estes modelos, dois se destacam pela sua ampla aplicação e especificidade em atingir principalmente neurônios DA na SNpc: MPTP e 6-OHDA (Dawson et al. 2018). Vale mencionar também o modelo de injeções crônicas de baixas doses de reserpina, um inibidor irreversível de VMAT2, que possibilita uma modulação progressiva da DP em animais (Ikram e Haleem 2019; Draoui et al. 2019; Leão et al. 2021). Além disso, a reserpina também desempenhar um bom papel em induzir sinais não motores da DP, como sinais cognitivos e sinais prodrômicos (Fernandes et al. 2012; Santos et al. 2013; Draoui et al. 2019).

Na decisão sobre o modelo animal a se aplicar neste estudo, escolheu-se o de lesão unilateral por injeção intraestriatal de 6-OHDA em camundongos. A 6-OHDA é uma neurotoxina análoga da dopamina e noradrenalina que, devido a sua similaridade com essas moléculas, possui afinidade com seus respectivos transportadores (transportador de dopamina (DAT) e noradrenalina). Dessa forma, essa neurotoxina exerce seu efeito principalmente sobre neurônios catecolaminérgicos. Após o acúmulo de 6-OHDA por essas células, uma série de eventos são desencadeados, comprometendo a homeostase intracelular e levando a neurodegeneração (Simola et al. 2007). Dentro do neurônio, a 6-OHDA induz a produção de moléculas citotóxicas e espécies reativas de oxigênio, promovendo o estresse oxidativo por meio de vias enzimáticas (metabolização por monoamino oxidase) e não enzimáticas (Cohen 1984; Cadet e Brannock 1997; Choi et al. 1999; Lotharius et al. 1999). Outro mecanismo de ação também associado com a 6-OHDA é o bloqueio do complexo 1 da mitocôndria, também contribuindo para a geração de espécies reativas de oxigênio (Glinka e Youdim 1995).

Dentro das principais vantagens de aplicação do modelo de 6-OHDA, está a sua capacidade de induzir sinais motores similares à DP a partir de uma depleção massiva dos neurônios DA na SNpc (Javoy et al. 1976; Jeon et al. 1995). A 6-OHDA pode ser injetada em três principais regiões para geração do parkinsonismo: SNpc, estriado e feixe medial do prosencéfalo; dentre as formas de injeções, pode-se formular diferentes modelos entre lesões unilaterais e bilaterais, com aplicações únicas ou múltiplas na tentativa de se reproduzir um modelo parkinsoniano mais robusto e com morte de neurônios DA em valores mais estáveis, sem variações extremas (Simola et al. 2007). De fato, o desafio de reprodução deste modelo está na sua alta variabilidade, ainda mais tratando-se de ser um modelo que necessita de uma cirurgia estereotáxica. Para tanto, a aplicação de ensaios comportamentais se torna importante por serem bons preditores sobre a extensão de lesão dopaminérgica induzida.

Em especial, os modelos de lesão unilateral por 6-OHDA é um dos modelos de DP amplamente usados na pesquisa pré-clínica, (Ungerstedt e Arbuthnott 1970; Costall et al. 1976; Robertson e Robertson 1989; Maneue et al. 1994). Destaca-se a disponibilidade de ensaios comportamentais, como os testes de comportamento rotatório induzido por agentes químicos (Anfetaminas ou apomorfina), contribuindo em prever a extensão da lesão dopaminérgica induzida (Iancu et al. 2005; Thiele et al. 2012). Além disso, testes que avaliam o comportamento motor espontâneo dos animais, como os testes

com o Rotarod, também apresentam uma boa sensibilidade para avaliar o grau de lesão unilateral (Iancu et al. 2005). Por último, importante ressaltar que a vantagem de se aplicar um modelo hemiparkinsoniano (lesão unilateral), é o uso do animal como seu próprio controle em ensaios de quantificação de neurônios (imuno-histoquímica). Por exemplo, em ensaios de imuno-histoquímica é possível se comparar ambos os hemisférios dos animais, em que um lado é afetado pela neurotoxina enquanto o outro mantém-se sem lesões, de forma a permitir observar mais claramente o grau de perda neuronal induzido.

Um ponto importante a se destacar sobre o modelo de 6-OHDA é o nível de alteração fisiológica sistêmica que podem ser observadas nos animais, sendo que este modelo é muitas vezes caracterizado por uma alta taxa de mortalidade entre os grupos, principalmente por afagia e adipsia (Bobela et al. 2014). Alterações como perda de peso e, principalmente, desidratação são normais nesse modelo e, por isso, o cuidado tanto no pós operatório como ao longo do estudo se torna necessário. A mortalidade é principalmente alta em modelos de injeção bilateral de 6-OHDA (Simola et al. 2007) ou em injeções unilaterais no feixe medial do prosencéfalo, podendo este atingir um valor de 84% de mortalidade (Lundblad et al. 2004).

No presente estudo, foi selecionado o modelo de lesão intraestriatal que, apesar do risco de variabilidade na perda dos neurônios DA, apresenta uma mortalidade menos expressiva dos animais injetados com a neurotoxina. Além disso, apesar das lesões induzidas pela injeção de 6-OHDA diretamente no SNpc ou no feixe medial do prosencéfalo caracterizarem uma lesão mais acentuada dos neurônios DA (Ungerstedt 1968), a injeção da 6-OHDA no estriado leva a uma perda mais lenta e progressiva dessas células (Sauer e Oertel 1994; Alvarez-Fischer et al. 2008). Ressalta-se ainda que a injeção estriatal da 6-OHDA causa uma neurodegeneração retrograda, agindo primeiro sobre os terminais axoniais dos neurônios DA no estriado (Berger et al. 1991; Sauer e Oertel 1994), enquanto a injeção da 6-OHDA direta sobre o SNpc ou feixe medial do prosencéfalo causa uma perda anterógrada das projeções estriatais desses neurônios (Ungerstedt 1968). Isso traz uma qualidade única ao modelo de injeção intraestriatal, visto que possibilita adequá-lo para uma perda neuronal progressiva, fortalecendo a sua similariedade com a DP. O modelo experimental aplicado neste trabalho levou em conta ainda a administração diária do peptídeo justamente como forma de impedir a progressão de perda neuronal. O modelo de injeção de 6-OHDA executado neste estudo seguiu os protocolos já estabelecidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Neurofarmacologia,

definindo a dose de 40 µg/4 µL de 6-OHDA (base livre) como a que representava idealmente a perda unilateral dos neurônios conjunta com a perda motora (Biolchi et al. 2020).

Importante ressaltar que um achado interessante obtido neste trabalho foi a diminuição da mortalidade entre os grupos injetados com 6-OHDA e tratados com as diferentes doses do peptídeo ao longo do estudo. No grupo 6-OHDA foi observada uma mortalidade de 33,3%, enquanto nos grupos tratados com a occidantalina-1202 nas doses de 2 e 4 mg/kg, a mortalidade foi de 18,2% e 12,5%, respectivamente. Os animais tratados com a occidantalina-1202 na dose de 8 mg/kg tiveram uma mortalidade igual a 0%, assim como os animais do grupo SHAM. A mortalidade observada no grupo 6-OHDA se mostrou bem reduzida à encontrada no modelo de lesão unilateral do SNpc por injeção no feixe medial do prosencéfalo, que atesta por aproximadamente 84% (Lundblad et al. 2004). Em comparação com modelos de injeção intraestriatal da 6-OHDA, o estudo de Alvarez-Fischer e colaboradores (2008) identificou uma mortalidade de aproximadamente 10% para lesões unilaterais (Alvarez-Fischer et al. 2008), enquanto o modelo aplicado neste estudo obteve uma mortalidade maior, tendo o valor de 33,3%.

Com relação aos ensaios comportamentais, o teste de Rotarod, que serviu para avaliar a condição motora do animal, foi sensível para indicar a perda do desempenho motor de forma progressiva. Como observado em estudos de lesão unilateral por injeção intraestriatal de 6-OHDA, a perda dos neurônios DA na SNpc é concomitante com a perda de desempenho motor. Alvarez-Fischer e colaboradores (2008) observaram que três dias após a lesão unilateral, os animais tiveram uma perda aproximada de 34,1% dos neurônios, com tempo de permanência aproximado de 13,9 segundos (animais seguiram o mesmo protocolo de permanência no Rotarod de 300 segundos); no sétimo dia de análise, a perda neuronal se acentuou, com os animais tendo morte neuronal aproximada de 67,8%, em contrapartida a um tempo de permanência de 148,9 segundos (Alvarez-Fischer et al. 2008). Neste estudo, os animais foram avaliados por um total de 56 dias, com a última análise mostrando perda neuronal de aproximadamente 82,1% dos neurônios e tempo de permanência no Rotarod de aproximadamente 220,7 segundos (Alvarez-Fischer et al. 2008). Esta melhora no desempenho motor dos animais, em discordância com a perda neuronal da região da SNpc, pode ser explicada por uma questão de mecanismo compensatório pré-sináptico no animal, visto que o estudo teve um tempo prolongado de avaliação (Bezard et al. 2003; Alvarez-Fischer et al. 2008).

No presente trabalho, os animais do grupo de 6-OHDA tiveram uma perda aproximada de 56% dos neurônios DA na SNpc, o que correlacionou a perda de seu desempenho motor. Um dos pontos que o difere com o trabalho de Alvarez-Fischer e colaboradores (2008) é o tempo de análise, em que, neste estudo, as análises de desempenho motor no Rotarod foram realizadas no quarto, quinto e sexto dia após a lesão unilateral (72, 96 e 120 horas após a lesão) e os animais foram eutanasiados no décimo segundo dia (Figura 3), enquanto Alvarez-Fischer e colaboradores (2008) fizeram uma análise mais prolongada, chegando a 56 dias. O que é interessante de se comparar entre os dois estudos é que ambos os modelos mostram a sensibilidade do teste Rotarod em mostrar a perda neuronal e a perda de desempenho motor dos animais, apesar de no presente trabalho, esta perda ter sido em um menor grau. Comparando-se os tempos de análises, no estudo de Alvarez-Fischer e colaboradores (2008) os animais permaneceram entre 13,9 segundos no Rotarod no terceiro dia após a lesão (Alvarez-Fischer et al. 2008), enquanto no presente estudo, os animais permaneceram em média 107,7 segundos no Rotarod no primeiro tempo de análise. Vale ressaltar que em humanos, estima-se uma perda de neurônios DA na SNpc na DP é de aproximadamente 60-70% para desenvolvimento dos primeiros sinais motores da doença (Grosch et al. 2016). Esta diferença entre os dois modelos pode ter sido pela lesão unilateral induzida neste trabalho ter sido menos expressiva, podendo se classificar como uma lesão intermediária.

Em estudos realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Neurofarmacologia com os protocolos similares aos aplicado neste estudo, Biolchi e colaboradores (2020) identificaram uma perda aproximada de 70,7% dos neurônios DA na SNpc com 7 dias de experimento (Biolchi et al. 2020), enquanto Campos (2016) observou uma perda maior que 75% dos neurônios com 21 dias de experimento (Campos 2016), que foram mais acentuadas que as identificadas neste trabalho (56% de perda neuronal aproximadamente). A relativa baixa perda neuronal pode ter sido por conta da variabilidade que o próprio modelo de injeção intraestriatal de 6-OHDA, o estriado é uma região extensa com diversas sub-regiões, o que pode ser responsável por variar o grau de lesão induzida (Kirik et al. 1998).

Com relação aos dados do ensaio de comportamento rotatório induzido por apomorfina, estes não mostraram diferenças significativas entre o grupo 6-OHDA e os grupos tratados com as diferentes doses de occidantalina-1202. A apomorfina é um agonista dopaminérgico com afinidade tanto para receptores D1 quanto para D2 e quando

aplicadas sobre o modelo de lesão unilateral do SNpc, ativa principalmente a região com perda dos neurônios DA (Creese et al. 1977). De fato, os animais do grupo 6-OHDA mostraram uma variabilidade alta nos valores de giros. Esta variabilidade pode ser justificada por este teste necessitar de uma neurodegeneração quase que total da região do SNpc. Estima-se que seja necessária uma perda maior que 90% dessas células para que se possa ter uma estabilidade sobre os valores de giros contralaterais (Creese et al. 1977). No presente estudo, foi atingida uma perda neuronal de 56% no grupo 6-OHDA, o que pode ter sido a causa da variabilidade na quantificação de giros do grupo. Dessa forma, suporta-se que a lesão unilateral induzida neste estudo tenha sido intermediária, atingindo uma extensão menor dos neurônios DA na SNpc

No entanto, apesar da baixa perda neuronal no grupo 6-OHDA, o tratamento com a dose de 8 mg/kg de occidentalina-1202 ainda assim foi capaz de desempenhar uma proteção sobre essas células. Esse grupo promoveu uma proteção aproximada de 60,7% dos neurônios DA na SNpc (perda de 39,3% dos neurônios; Figura 10), o que foi suficiente para melhorar o desempenho motor dos animais de forma progressiva, permanecendo entre 71,8% do tempo total no Rotarod no último dia de análise de desempenho motor (Figura 3; Figura 7). Além disso, um fato interessante foi a boa tolerabilidade que os animais apresentaram com a dose máxima aplicada da occidentalina-1202, quando injetada por via subcutânea. Outro fator importante, e o que a torna um peptídeo ainda mais interessante, é a sua capacidade de passar a BHE.

Importante ressaltar que no âmbito de peptídeos derivados de fontes naturais, como é o caso de peptídeos isolado de venenos e peçonhas, alguns limitantes são presentes em suas características, como: baixa meia-vida plasmática (peptídeos são facilmente degradados por enzimas) e baixa estabilidade química e física (Fosgerau e Hoffmann 2015). Felizmente, existem estratégias eficazes que podem contornar as desvantagens sobre peptídeos derivados de fontes naturais, como o uso do desenho racional, para melhorar características intrínsecas farmacodinâmicas e farmacocinéticas, conjugação com nanopartículas e PEG, uso de peptídeos multifuncionais e entre outras tecnologias que visem o uso de vias alternativas de administração (Fosgerau e Hoffmann 2015).

Com relação a occidentalina-1202, além do seu bom desempenho na administração subcutânea, realçando a sua disponibilidade para o tratamento em vias

alternativas – anteriormente, a occidentalina-1202 já havia mostrado efeito neuroprotetor sobre a administração intraperitoneal (Mortari 2007).

Ainda assim, pode-se considerar que em estudos futuros se aumente o número de administrações diárias da occidentalina-1202 ou formular a conjugação do peptídeo com uma cauda PEG, como é o caso do NLY01, peptídeo com sequência similar ao exendin-4 com uma cauda PEG. No estudo de Yun e colaboradores (2018), foi identificado que a peguilação do exendin-4 estendeu em 40 vezes a meia-vida do peptídeo em primatas não humanos, desempenhando uma melhora motora e atividade neuroprotetora significativa em diferentes modelos animais de DP (Yun et al. 2018).

Conclui-se, assim, que a occidentalina-1202 é um peptídeo com promissor efeito antiparkinsoniano e potencial efeito neuroprotetor para o tratamento da DP, agindo sobre a melhora do desempenho motor e de preservação dos neurônios DA na SNpc.

Perspectivas futuras

Importante que em estudos futuros seja realizada uma busca sobre o mecanismo de ação da occidentalina-1202. Uma via interessante a se considerar é a de bloqueadores de canais de cálcio, visto o seu potencial para tratamento para a DP e epilepsia e a característica já observada da neurovespina em bloquear canais $Ca_v1.2$ (Campos 2020). Vale também considerar a conjugação da occidentalina-1202 com cauda PEG ou com nanopartículas, afim de melhorar a sua meia-vida plasmática.

Um último ponto importante a se destacar é a utilização de um modelo de DP alternativo a 6-OHDA. Apesar de ser um modelo já bem descrito e amplamente usado para pesquisas pré-clínicas envolvendo a DP, a 6-OHDA ainda é considerado um modelo incompleto no quesito similaridade com a etiologia da doença. Uma das características principais da DP, além da perda de neurônios DA na SNpc, é a agregação da alfa-sinucleína como fator precoce e de progressão da doença. Um novo modelo que vem sendo bastante aplicado é o de fibrilas pré-formadas de alfa-sinucleína, que inclui a injeção de fibrilas de alfa-sinucleína diretamente sobre o estriado do animal (Luk et al. 2012). Este modelo causa a perda progressiva dos neurônios DA na SNpc e o acúmulo da alfa-sinucleína, estendendo-se até outras regiões do encéfalo do animal (Luk et al. 2012; Abdelmotilib et al. 2017; Stoyka et al. 2020).

Referências Bibliográficas

- Abdelmotilib, Hisham, Tyler Maltbie, Vedad Delic, Zhiyong Liu, Xianzhen Hu, Kyle B. Fraser, Mark S. Moehle, et al. 2017. “ α -Synuclein Fibril-Induced Inclusion Spread in Rats and Mice Correlates with Dopaminergic Neurodegeneration.” *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.05.014>.
- Alvarez-Fischer, Daniel, Carmen Henze, Corinna Strenzke, Jan Westrich, Boris Ferger, Günter U. Höglinger, Wolfgang H. Oertel, and Andreas Hartmann. 2008. “Characterization of the Striatal 6-OHDA Model of Parkinson’s Disease in Wild Type and α -Synuclein-Deleted Mice.” *Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.10.012>.
- Amaral, H. de O., V. Monge-Fuentes, A. Biolchi Mayer, G.A. Alves Campos, K. Soares Lopes, L.C. Camargo, M. Ferroni Schwartz, P. Galante, and M.R. Mortari. 2019. “Animal Venoms: Therapeutic Tools for Tackling Parkinson’s Disease.” *Drug Discovery Today* 24 (11). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.09.004>.
- Angot, Elodie, Jennifer A. Steiner, Christian Hansen, Jia Yi Li, and Patrik Brundin. 2010. “Are Synucleinopathies Prion-like Disorders?” *The Lancet Neurology*. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70213-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70213-1).
- Armstrong, Melissa J., and Michael S. Okun. 2020. “Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review.” *JAMA - Journal of the American Medical Association*. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.22360>.
- Assous, Maxime, Laurence Had-Aissouni, Paolo Gubellini, Christophe Melon, Imane Nafia, Pascal Salin, Lydia Kerkerian-Le-Goff, and Philippe Kachidian. 2014. “Progressive Parkinsonism by Acute Dysfunction of Excitatory Amino Acid Transporters in the Rat Substantia Nigra.” *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.01.011>.
- Athauda, Dilan, and Thomas Foltynie. 2016. “The Glucagon-like Peptide 1 (GLP) Receptor as a Therapeutic Target in Parkinson’s Disease: Mechanisms of Action.” *Drug Discovery Today* 21 (5): 802–18. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.01.013>.
- Athauda, Dilan, Kate Maclagan, Simon S. Skene, Martha Bajwa-Joseph, Dawn Letchford, Kashfia Chowdhury, Steve Hibbert, et al. 2017. “Exenatide Once

- Weekly versus Placebo in Parkinson's Disease: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial." *The Lancet* 390 (10103): 1664–75.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31585-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31585-4).
- Aviles-Olmos, Iciar, John Dickson, Zinovia Kefalopoulou, Atbin Djamshidian, Peter Ell, Therese Soderlund, Peter Whitton, et al. 2013. "Exenatide and the Treatment of Patients with Parkinson's Disease." *The Journal of Clinical Investigation*.
<https://doi.org/10.1172/JCI68295>.
- Aviles-Olmos, Iciar, John Dickson, Zinovia Kefalopoulou, Atbin Djamshidian, Joshua Kahan, Peter Ell, Peter Whitton, et al. 2015. "Motor and Cognitive Advantages Persist 12 Months after Exenatide Exposure in Parkinson's Disease." *Journal of Parkinson's Disease* 4 (3): 337–44. <https://doi.org/10.3233/JPD-140364>.
- Axelsen, Tobias M., and David P.D. Woldbye. 2018. "Gene Therapy for Parkinson's Disease, an Update." *Journal of Parkinson's Disease*. <https://doi.org/10.3233/JPD-181331>.
- Bartels, Tim, Joanna G. Choi, and Dennis J. Selkoe. 2011. "α-Synuclein Occurs Physiologically as a Helically Folded Tetramer That Resists Aggregation." *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/nature10324>.
- Berg, Daniela, Ronald B. Postuma, Charles H. Adler, Bastiaan R. Bloem, Piu Chan, Bruno Dubois, Thomas Gasser, et al. 2015. "MDS Research Criteria for Prodromal Parkinson's Disease." *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.26431>.
- Berger, Karin, Serge Przedborski, and Jean Lud Cadet. 1991. "Retrograde Degeneration of Nigrostriatal Neurons Induced by Intrastratial 6-Hydroxydopamine Injection in Rats." *Brain Research Bulletin*. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(91\)90242-C](https://doi.org/10.1016/0361-9230(91)90242-C).
- Berridge, Michael J. 1998. "Neuronal Calcium Signaling." *Neuron*.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80510-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80510-3).
- Bertilsson, Göran, Cesare Patrone, Olof Zachrisson, Annica Andersson, Karin Dannaeus, Jessica Heidrich, Jarkko Kortessmaa, et al. 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 (2): 326–38. <https://doi.org/10.1002/jnr.21483>.

- Bezard, Erwan, Christian E. Gross, and Jonathan M. Brotchie. 2003. "Presymptomatic Compensation in Parkinson's Disease Is Not Dopamine-Mediated." *Trends in Neurosciences*. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00038-9).
- Bezprozvanny, Ilya. 2009. "Calcium Signaling and Neurodegenerative Diseases." *Trends in Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.01.001>.
- Biolchi, Andréia Mayer, Danilo Gustavo Rodrigues de Oliveira, Henrique de Oliveira Amaral, Gabriel Avohay Alves Campos, Jacqueline Coimbra Gonçalves, Adolfo Carlos Barros de Souza, Marcos Robalinho Lima, Luciano Paulino Silva, and Márcia Renata Mortari. 2020. "Fraternine, a Novel Wasp Peptide, Protects against Motor Impairments in 6-OHDA Model of Parkinsonism." *Toxins*. <https://doi.org/10.3390/toxins12090550>.
- Biolchi, A. M. 2018. Novos analógos da Fraternalina: avaliação do efeito antiparkinsoniano em modelo murino da Doença de Parkinson e identificação dos alvos farmacológicos. *Tese (Doutorado em Biologia Animal)*. Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro.
- Blandini, F., K. H. Braunewell, D. Manahan-Vaughan, F. Orzi, and Paolo Sarti. 2004. "Neurodegeneration and Energy Metabolism: From Chemistry to Clinics." In *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401323>.
- Bobela, Wojciech, Lu Zheng, and Bernard L. Schneider. 2014. "Overview of Mouse Models of Parkinson's Disease." *Current Protocols in Mouse Biology* 4 (3): 121–39. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo140092>.
- Bolam, J. Paul, and Eleftheria K. Pissadaki. 2012. "Living on the Edge with Too Many Mouths to Feed: Why Dopamine Neurons Die." *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.25135>.
- Bose, Anindita, and M. Flint Beal. 2016. "Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease." *Journal of Neurochemistry*, 216–31. <https://doi.org/10.1111/jnc.13731>.
- Braak, Heiko, Estifanos Ghebremedhin, Udo Rüb, Hansjürgen Bratzke, and Kelly Del Tredici. 2004. "Stages in the Development of Parkinson's Disease-Related Pathology." *Cell and Tissue Research*. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0956-9>.
- Braak, Heiko, Kelly Del Tredici, Hansjürgen Bratzke, John Hamm-Clement, Daniele Sandmann-Keil, and Udo Rüb. 2002. "Staging of the Intracerebral Inclusion Body

- Pathology Associated with Idiopathic Parkinson's Disease (Preclinical and Clinical Stages)." *Journal of Neurology, Supplement*. <https://doi.org/10.1007/s00415-002-1301-4>.
- Brini, Marisa, Tito Cali, Denis Ottolini, and Ernesto Carafoli. 2014. "Neuronal Calcium Signaling: Function and Dysfunction." *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1550-7>.
- Brochard, Vanessa, Béhazine Combadière, Annick Prigent, Yasmina Laouar, Aline Perrin, Virginie Beray-berthat, Olivia Bonduelle, et al. 2009. "Infiltration of CD4+ Lymphocytes into the Brain Contributes to Neurodegeneration in a Mouse Model of Parkinson Disease." *The Journal of Clinical Investigation* 119 (1). <https://doi.org/10.1172/JCI36470DS1>.
- Brochard, Vanessa, Béhazine Combadière, Annick Prigent, Yasmina Laouar, Aline Perrin, Virginie Beray-Berthat, Olivia Bonduelle, et al. 2009. "Infiltration of CD4+ Lymphocytes into the Brain Contributes to Neurodegeneration in a Mouse Model of Parkinson Disease." *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI36470>.
- Brok, Melina G.H.E. den, Jan Willem van Dalen, Willem A. van Gool, Eric P. Moll van Charante, Rob M.A. de Bie, and Edo Richard. 2015. "Apathy in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.26208>.
- Brosenitsch, T. A., and D. M. Katz. 2001. "Physiological Patterns of Electrical Stimulation Can Induce Neuronal Gene Expression by Activating N-Type Calcium Channels." *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-08-02571.2001>.
- Brundin, Patrik, Ronald Melki, and Ron Kopito. 2010. "Prion-like Transmission of Protein Aggregates in Neurodegenerative Diseases." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm2873>.
- Bryan, Jenny. 2009. "From Snake Venom to ACE Inhibitor - The Discovery and Rise of Captopril." *Pharmaceutical Journal*.
- Cadet, Jean Lud, and Christie Brannock. 1997. "Free Radicals and the Pathobiology of Brain Dopamine Systems." *Neurochemistry International*.

[https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(97\)00031-4](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(97)00031-4).

Campos, G. A. A. 2016. Avaliação da ação antiparkinsoniana do peptídeo Neurovespina no modelo murino da Doença de Parkinson. *Tese (Mestrado em Biologia Animal)*. Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro.

Campos, G. A. A. 2020 Investigação do mecanismo de ação e do alvo farmacológico do peptídeo neuroprotetor Neurovespina. *Tese (Doutorado em Biologia Animal)*. Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro.

Capiod, Thierry. 2016. “Extracellular Calcium Has Multiple Targets to Control Cell Proliferation.” In *Advances in Experimental Medicine and Biology*.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-26974-0_7.

Carneiro, L. d. A. 2013. Avaliação antiepiléptica e neuroprotetora de dois peptídeos sintetizados a partir da Occidentalina-1202 isolada da vespa social *Polybia occidentalis*. *Tese (Mestrado em Biologia Animal)*. Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro.

Celardo, I., L. M. Martins, and S. Gandhi. 2014. “Unravelling Mitochondrial Pathways to Parkinson’s Disease.” *British Journal of Pharmacology*.
<https://doi.org/10.1111/bph.12433>.

Chan, C. Savio, Tracy S. Gertler, and D. James Surmeier. 2009. “Calcium Homeostasis, Selective Vulnerability and Parkinson’s Disease.” *Trends in Neurosciences*.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.01.006>.

Chan, C. Savio, Jaime N. Guzman, Ema Ilijic, Jeff N. Mercer, Caroline Rick, Tatiana Tkatch, Gloria E. Meredith, and D. James Surmeier. 2007. “‘Rejuvenation’ Protects Neurons in Mouse Models of Parkinson’s Disease.” *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/nature05865>.

Chaudhuri, K. Ray, Daniel G. Healy, and Anthony H.V. Schapira. 2006. “Non-Motor Symptoms of Parkinson’s Disease: Diagnosis and Management.” *Lancet Neurology*. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70373-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70373-8).

Chen, Na, Siqi Xu, Yuhan Zhang, and Feng Wang. 2018. “Animal Protein Toxins: Origins and Therapeutic Applications.” *Biophysics Reports*.
<https://doi.org/10.1007/s41048-018-0067-x>.

Cho, Seung Yeon, So Ra Shim, Hak Young Rhee, Hi Joon Park, Woo Sang Jung, Sang

- Kwan Moon, Jung Mi Park, Chang Nam Ko, Ki Ho Cho, and Seong Uk Park. 2012. "Effectiveness of Acupuncture and Bee Venom Acupuncture in Idiopathic Parkinson's Disease." *Parkinsonism and Related Disorders* 18 (8): 948–52.
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2012.04.030>.
- Choi, Won Seok, So Young Yoon, Tae H. Oh, Eui Ju Choi, Karen L. O'Malley, and Young J. Oh. 1999. "Two Distinct Mechanisms Are Involved in 6-Hydroxydopamine- and MPP+- Induced Dopaminergic Neuronal Cell Death: Role of Caspases, ROS, and JNK." *Journal of Neuroscience Research*.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990701\)57:1<86::AID-JNR9>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990701)57:1<86::AID-JNR9>3.0.CO;2-E).
- Chou, Kelvin L., Mark Stacy, Tanya Simuni, Janis Miyasaki, Wolfgang H. Oertel, Kapil Sethi, Hubert H. Fernandez, and Fabrizio Stocchi. 2018. "The Spectrum of 'off' in Parkinson's Disease: What Have We Learned over 40 Years?" *Parkinsonism and Related Disorders*.
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.02.001>.
- Chung, Eun Sook, Himchan Kim, Gihyun Lee, Soojin Park, Hyunseong Kim, and Hyunsu Bae. 2012. "Neuro-Protective Effects of Bee Venom by Suppression of Neuroinflammatory Responses in a Mouse Model of Parkinson's Disease: Role of Regulatory T Cells." *Brain, Behavior, and Immunity* 26 (8): 1322–30.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.08.013>.
- Clapham, David E. 2007. "Calcium Signaling." *Cell*.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>.
- Clark, Graeme C., Nicholas R. Casewell, Christopher T. Elliott, Alan L. Harvey, Andrew G. Jamieson, Peter N. Strong, and Andrew D. Turner. 2019. "Friends or Foes? Emerging Impacts of Biological Toxins." *Trends in Biochemical Sciences*.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.12.004>.
- Cohen, G. 1984. "Oxy-Radical Toxicity in Catecholamine Neurons." *NeuroToxicology*.
- Costall, Brenda, Robert J. Naylor, and Chris Pycoc. 1976. "Non-Specific Supersensitivity of Striatal Dopamine Receptors after 6-Hydroxydopamine Lesion of the Nigrostriatal Pathway." *European Journal of Pharmacology*.
[https://doi.org/10.1016/0014-2999\(76\)90229-6](https://doi.org/10.1016/0014-2999(76)90229-6).

- Coxhead, Jonathan, Marzena Kurzawa-Akanbi, Rafiqul Hussain, Angela Pyle, Patrick Chinnery, and Gavin Hudson. 2015. "Somatic MtDNA Variation Is an Important Component of Parkinson's Disease." *Neurobiology of Aging*.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.10.036>.
- Creese, Ian, David R. Burt, and Solomon H. Snyder. 1977. "Dopamine Receptor Binding Enhancement Accompanies Lesion-Induced Behavioral Supersensitivity." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.877576>.
- Dawson, Ted M., and Valina L. Dawson. 2003. "Molecular Pathways of Neurodegeneration in Parkinson's Disease." *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.1087753>.
- Dawson, Ted M., Todd E. Golde, and Clotilde Lagier-Tourenne. 2018. "Animal Models of Neurodegenerative Diseases." *Nature Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1038/s41593-018-0236-8>.
- Dehay, Benjamin, Mathieu Bourdenx, Philippe Gorry, Serge Przedborski, Miquel Vila, Stéphane Hunot, Andrew Singleton, et al. 2015. "Targeting α -Synuclein for Treatment of Parkinson's Disease: Mechanistic and Therapeutic Considerations." *The Lancet Neurology* 14 (8): 855–66. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00006-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00006-X).
- Dettmer, Ulf, Andrew J. Newman, Eric S. Luth, Tim Bartels, and Dennis Selkoe. 2013. "In Vivo Cross-Linking Reveals Principally Oligomeric Forms of α -Synuclein and β -Synuclein in Neurons and Non-Neural Cells." *Journal of Biological Chemistry*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.403311>.
- Dettmer, Ulf, Andrew J. Newman, Frank Soldner, Eric S. Luth, Nora C. Kim, Victoria E. Von Saucken, John B. Sanderson, Rudolf Jaenisch, Tim Bartels, and Dennis Selkoe. 2015. "Parkinson-Causing α -Synuclein Missense Mutations Shift Native Tetramers to Monomers as a Mechanism for Disease Initiation." *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms8314>.
- Dickson, Dennis W., Heiko Braak, John E. Duda, Charles Duyckaerts, Thomas Gasser, Glenda M. Halliday, John Hardy, et al. 2009. "Neuropathological Assessment of Parkinson's Disease: Refining the Diagnostic Criteria." *The Lancet Neurology*.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70238-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70238-8).

- Dölle, Christian, Irene Flønes, Gonzalo S. Nido, Hrvoje Miletic, Nelson Osuagwu, Stine Kristoffersen, Peer K. Lilleng, et al. 2016. “Defective Mitochondrial DNA Homeostasis in the Substantia Nigra in Parkinson Disease.” *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms13548>.
- Doorn, Karlijn J., Tim Moors, Benjamin Drukarch, Wilma D.J. van de Berg, Paul J. Lucassen, and Anne Marie van Dam. 2014. “Microglial Phenotypes and Toll-like Receptor 2 in the Substantia Nigra and Hippocampus of Incidental Lewy Body Disease Cases and Parkinson’s Disease Patients.” *Acta Neuropathologica Communications*. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0090-1>.
- Dorsey, E. Ray, and Bastiaan R. Bloem. 2018. “The Parkinson Pandemic - A Call to Action.” *JAMA Neurology* 75 (1): 9–10. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.3299>.
- Draoui, Ahmed, Omar El Hiba, El Khiat Abdelaati, Abdellatif Abbaoui, Radouane El Fari, Mohamed Aitihya, and Halima Gamrani. 2019. “Differential Impairment of Short Working and Spatial Memories in a Rat Model of Progressive Parkinson’s Disease Onset: A Focus on the Prodromal Stage.” *Brain Research Bulletin*. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.06.014>.
- Eng, John, Wayne A. Kleinman, Latika Singh, Gurcharn Singh, and Jean Pierre Raufman. 1992. “Isolation and Characterization of Exendin-4, an Exendin-3 Analogue, from *Heloderma Suspectum* Venom: Further Evidence for an Exendin Receptor on Dispersed Acini from Guinea Pig Pancreas.” *Journal of Biological Chemistry* 267 (11): 7402–5. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0745-y>.
- Feigin, V. L., R. V. Krishnamurthi, A. M. Theadom, A. A. Abajobir, S. R. Mishra, M. B. Ahmed, K. H. Abate, et al. 2017. “Global, Regional, and National Burden of Neurological Disorders during 1990–2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2015.” *The Lancet Neurology* 16 (11): 877–97. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30299-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30299-5).
- Fernandes, Valéria S., José R. Santos, Anderson H.F.F. Leão, André M. Medeiros, Thieza G. Melo, Geison S. Izídio, Alicia Cabral, et al. 2012. “Repeated Treatment with a Low Dose of Reserpine as a Progressive Model of Parkinson’s Disease.” *Behavioural Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.03.008>.

- Fleming, Sheila M. 2017. "Mechanisms of Gene-Environment Interactions in Parkinson's Disease." *Current Environmental Health Reports*.
<https://doi.org/10.1007/s40572-017-0143-2>.
- Fosgerau, Keld, and Torsten Hoffmann. 2015. "Peptide Therapeutics: Current Status and Future Directions." *Drug Discovery Today* 20 (1): 122–28.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>.
- Fox, Susan H., Regina Katzenschlager, Shen Yang Lim, Brandon Barton, Rob M.A. de Bie, Klaus Seppi, Miguel Coelho, and Cristina Sampaio. 2018. "International Parkinson and Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine Review: Update on Treatments for the Motor Symptoms of Parkinson's Disease." *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.27372>.
- Fry, Bryan G., Kim Roelants, Donald E. Champagne, Holger Scheib, Joel D.A. Tyndall, Glenn F. King, Timo J. Nevalainen, et al. 2009. "The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms." *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 10 (1): 483–511.
<https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164356>.
- Gandhi, Sonia, Alison Wood-Kaczmar, Zhi Yao, Helene Plun-Favreau, Emma Deas, Kristina Klupsch, Julian Downward, et al. 2009. "PINK1-Associated Parkinson's Disease Is Caused by Neuronal Vulnerability to Calcium-Induced Cell Death." *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.02.013>.
- Garcia-Ruiz, Pedro J., Juan Carlos Martinez Castrillo, Araceli Alonso-Canovas, Antonio Herranz Barcenas, Lydia Vela, Pilar Sanchez Alonso, Marina Mata, Nuria Olmedilla Gonzalez, and Ignacio Mahillo Fernandez. 2014. "Impulse Control Disorder in Patients with Parkinson's Disease under Dopamine Agonist Therapy: A Multicentre Study." *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*.
<https://doi.org/10.1136/jnnp-2013-306787>.
- Gazerani, Parisa. 2017. "Unfolding the Hidden Potential of Venomics for Chronic Pain." *Future Neurology*. <https://doi.org/10.2217/fnl-2017-0001>.
- Gazerani, Parisa, and Brian Edwin Cairns. 2014. "Venom-Based Biotoxins as Potential Analgesics." *Expert Review of Neurotherapeutics*.
<https://doi.org/10.1586/14737175.2014.962518>.

- Ge, Preston, Valina L. Dawson, and Ted M. Dawson. 2020. "PINK1 and Parkin Mitochondrial Quality Control: A Source of Regional Vulnerability in Parkinson's Disease." *Molecular Neurodegeneration*. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00367-7>.
- George, Sonia, Nolwen L. Rey, Nicole Reichenbach, Jennifer A. Steiner, and Patrik Brundin. 2013. "α-Synuclein: The Long Distance Runner." In *Brain Pathology*. <https://doi.org/10.1111/bpa.12046>.
- Giannoccaro, Maria Pia, Chiara La Morgia, Giovanni Rizzo, and Valerio Carelli. 2017. "Mitochondrial DNA and Primary Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease." *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.26966>.
- Glinka, Yelena Y., and Moussa B.H. Youdim. 1995. "Inhibition of Mitochondrial Complexes I and IV by 6-Hydroxydopamine." *European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology And*. [https://doi.org/10.1016/0926-6917\(95\)90040-3](https://doi.org/10.1016/0926-6917(95)90040-3).
- Goke, R., H. C. Fehmann, T. Linn, H. Schmidt, M. Krause, J. Eng, and B. Goke. 1993. "Exendin-4 Is a High Potency Agonist and Truncated Exendin-(9-39)-Amide an Antagonist at the Glucagon-like Peptide 1-(7-36)-Amide Receptor of Insulin-Secreting β-Cells." *Journal of Biological Chemistry* 268 (26): 19650–55.
- Gray, Richard, N. Ives, C. Rick, S. Patel, A. Gray, C. Jenkinson, E. McIntosh, et al. 2014. "Long-Term Effectiveness of Dopamine Agonists and Monoamine Oxidase B Inhibitors Compared with Levodopa as Initial Treatment for Parkinson's Disease (PD MED): A Large, Open-Label, Pragmatic Randomised Trial." *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60683-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60683-8).
- Grenier, Karl, Gian Luca McLelland, and Edward A. Fon. 2013. "Parkin- and PINK1-Dependent Mitophagy in Neurons: Will the Real Pathway Please Stand Up?" *Frontiers in Neurology*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00100>.
- Grosch, Janina, Jürgen Winkler, and Zacharias Kohl. 2016. "Early Degeneration of Both Dopaminergic and Serotonergic Axons – A Common Mechanism in Parkinson's Disease." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 10 (December): 1–8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00293>.
- Grünewald, Anne, Karolina A. Rygiel, Philippa D. Hepplewhite, Christopher M.

- Morris, Martin Picard, and Doug M. Turnbull. 2016. "Mitochondrial DNA Depletion in Respiratory Chain-Deficient Parkinson Disease Neurons." *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.24571>.
- Guzman, Jaime N., Javier Sánchez-Padilla, C. Savio Chan, and D. James Surmeier. 2009. "Robust Pacemaking in Substantia Nigra Dopaminergic Neurons." *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2519-09.2009>.
- Guzman, Jaime N., Javier Sanchez-Padilla, David Wokosin, Jyothisri Kondapalli, Ema Ilijic, Paul T. Schumacker, and D. James Surmeier. 2010. "Oxidant Stress Evoked by Pacemaking in Dopaminergic Neurons Is Attenuated by DJ-1." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature09536>.
- Halliday, Glenda M., Janice L. Holton, Tamas Revesz, and Dennis W. Dickson. 2011. "Neuropathology Underlying Clinical Variability in Patients with Synucleinopathies." *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0852-9>.
- Harkavyi, Alexander, Amjad Abuirmeileh, Rebecca Lever, Ann E. Kingsbury, Christopher S. Biggs, and Peter S. Whitton. 2008. "Glucagon-like Peptide 1 Receptor Stimulation Reverses Key Deficits in Distinct Rodent Models of Parkinson's Disease." *Journal of Neuroinflammation* 5. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-19>.
- Harm, Ashley S., Shuwen Cao, Amber L. Rowse, Aaron D. Thome, Xinru Li, Leandra R. Mangieri, Randy Q. Cron, John J. Shacka, Chander Raman, and David G. Standaert. 2013. "MHCII Is Required for α -Synuclein-Induced Activation of Microglia, CD4 T Cell Proliferation, and Dopaminergic Neurodegeneration." *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5610-12.2013>.
- Harms, Ashley S., Vedad Delic, Aaron D. Thome, Nicole Bryant, Zhiyong Liu, Sidhanth Chandra, Asta Jurkuvenaite, and Andrew B. West. 2017. " α -Synuclein Fibrils Recruit Peripheral Immune Cells in the Rat Brain Prior to Neurodegeneration." *Acta Neuropathologica Communications*. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0494-9>.
- Hartmann, Andreas, Julia Müllner, Niklaus Meier, Helke Hesekamp, Priscilla Van Meerbeeck, Marie Odile Habert, Aurélie Kas, et al. 2016. "Bee Venom for the

- Treatment of Parkinson Disease - A Randomized Controlled Clinical Trial.” *PLoS ONE* 11 (7): 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158235>.
- Hirsch, Etienne C., and David G. Standaert. 2021. “Ten Unsolved Questions About Neuroinflammation in Parkinson’s Disease.” *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.28075>.
- Hirsch, Etienne, Ann M. Graybiel, and Yves A. Agid. 1988. “Melanized Dopaminergic Neurons Are Differentially Susceptible to Degeneration in Parkinson’s Disease.” *Nature*. <https://doi.org/10.1038/334345a0>.
- Houlden, Henry, and Andrew B. Singleton. 2012. “The Genetics and Neuropathology of Parkinson’s Disease.” *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1013-5>.
- Iancu, Ruxandra, Paul Mohapel, Patrik Brundin, and Gesine Paul. 2005. “Behavioral Characterization of a Unilateral 6-OHDA-Lesion Model of Parkinson’s Disease in Mice.” *Behavioural Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.02.023>.
- Iannaccone, S., C. Cerami, M. Alessio, V. Garibotto, A. Panzacchi, S. Olivieri, G. Gelsomino, R. M. Moresco, and D. Perani. 2013. “In Vivo Microglia Activation in Very Early Dementia with Lewy Bodies, Comparison with Parkinson’s Disease.” *Parkinsonism and Related Disorders*. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2012.07.002>.
- Iketani, Ryo, Yohei Kawasaki, and Hiroshi Yamada. 2017. “Comparative Utility of Atypical Antipsychotics for the Treatment of Psychosis in Parkinson’s Disease: A Systematic Review and Bayesian Network Meta-Analysis.” *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00602>.
- Ikram, Huma, and Darakhshan Jabeen Haleem. 2019. “Repeated Treatment with a Low Dose of Reserpine as a Progressive Model of Parkinson’s Dementia.” *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*.
- Imamura, Kazuhiro, Nozomi Hishikawa, Makoto Sawada, Toshiharu Nagatsu, Mari Yoshida, and Yoshio Hashizume. 2003. “Distribution of Major Histocompatibility Complex Class II-Positive Microglia and Cytokine Profile of Parkinson’s Disease Brains.” *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-003-0766-2>.

- J. Resende, Janete, Gilberto M. de M. Santos, Carlos C. Bichara Filho, and Miriam Gimenes. 2001. "Atividade Diária de Busca de Recursos Pela Vespa Social *Polybia Occidentalis Occidentalis* (Olivier, 1791) (Hymenoptera, Vespidae)." *Revista Brasileira de Zoociências*.
- James Surmeier, D., Jaime N. Guzman, Javier Sanchez, and Paul T. Schumacker. 2012. "Physiological Phenotype and Vulnerability in Parkinson's Disease." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009290>.
- Janezic, Stephanie, Sarah Threlfell, Paul D. Dodson, Megan J. Dowie, Tonya N. Taylor, Dawid Potgieter, Laura Parkkinen, et al. 2013. "Deficits in Dopaminergic Transmission Precede Neuron Loss and Dysfunction in a New Parkinson Model." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309143110>.
- Javoy, France, Constantino Sotelo, Alain Herbet, and Yves Agid. 1976. "Specificity of Dopaminergic Neuronal Degeneration Induced by Intracerebral Injection of 6-Hydroxydopamine in the Nigrostriatal Dopamine System." *Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(76\)90877-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90877-5).
- Jeanne, R L. 1980. "Evolution of Social Behavior in the Vespidae." *Annual Review of Entomology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.25.010180.002103>.
- Jeon, Beom S., Vernice Jackson-Lewis, and Robert E. Burke. 1995. "6-Hydroxydopamine Lesion of the Rat Substantia Nigra: Time Course and Morphology of Cell Death." *Neurodegeneration*. <https://doi.org/10.1006/neur.1995.0016>.
- Kalia, Lorraine V., and Anthony E. Lang. 2015. "Parkinson's Disease." *The Lancet* 386 (9996): 896–912. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3).
- Kim, Mi Eun, Joo Yeon Lee, Kyung Moon Lee, Hee Ra Park, Eunjin Lee, Yujeong Lee, Jun Sik Lee, and Jaewon Lee. 2016. "Neuroprotective Effect of Bee Venom Is Mediated by Reduced Astrocyte Activation in a Subchronic MPTP-Induced Model of Parkinson's Disease." *Archives of Pharmacal Research*. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0802-0>.
- Kim, Sehee, Minho Moon, and Seungjoon Park. 2009. "Exendin-4 Protects Dopaminergic Neurons by Inhibition of Microglial Activation and Matrix

- Metalloproteinase-3 Expression in an Animal Model of Parkinson's Disease.”
Journal of Endocrinology 202 (3): 431–39. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0132>.
- King, Glenn F. 2011. “Venoms as a Platform for Human Drugs: Translating Toxins into Therapeutics.” *Expert Opinion on Biological Therapy*.
<https://doi.org/10.1517/14712598.2011.621940>.
- Kirik, Deniz, Carl Rosenblad, and Anders Björklund. 1998. “Characterization of Behavioral and Neurodegenerative Changes Following Partial Lesions of the Nigrostriatal Dopamine System Induced by Intrastriatal 6-Hydroxydopamine in the Rat.” *Experimental Neurology* 152 (2): 259–77.
<https://doi.org/10.1006/exnr.1998.6848>.
- Kitada, Tohru, Shuichi Asakawa, Nobutaka Hattori, Hiroto Matsumine, Yasuhiro Yamamura, Shinsei Minoshima, Masayuki Yokochi, Yoshikuni Mizuno, and Nobuyoshi Shimizu. 1998. “Mutations in the Parkin Gene Cause Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism.” *Nature*. <https://doi.org/10.1038/33416>.
- Klein, Christine, and Ana Westenberger. 2012. “Genetics of Parkinson's Disease.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008888>.
- Koprich, James B., Lorraine V. Kalia, and Jonathan M. Brotchie. 2017. “Animal Models of α -Synucleinopathy for Parkinson Disease Drug Development.” *Nature Reviews Neuroscience* 18 (9): 515–29. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.75>.
- Kordower, Jeffrey H., C. Warren Olanow, Hemraj B. Dodiya, Yaping Chu, Thomas G. Beach, Charles H. Adler, Glenda M. Halliday, and Raymond T. Bartus. 2013. “Disease Duration and the Integrity of the Nigrostriatal System in Parkinson's Disease.” *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awt192>.
- Langston, J., P Ballard, J. Tetrud, and I Irwin. 1983. “Chronic Parkinsonism in Humans Due to a Product of Meperidine-Analog Synthesis.” *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.6823561>.
- Lau, Jolene L, and Michael K Dunn. 2018. “Bioorganic & Medicinal Chemistry Therapeutic Peptides : Historical Perspectives , Current Development Trends , and Future Directions.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 26 (10): 2700–2707.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>.

- Leão, Anderson H.F.F., Ywlliane S.R. Meurer, Thalma A. Freitas, André M. Medeiros, Vanessa C. Abílio, Geison S. Izídio, Isaltino M. Conceição, Alessandra M. Ribeiro, and Regina H. Silva. 2021. “Changes in the Mesocorticolimbic Pathway after Low Dose Reserpine-Treatment in Wistar and Spontaneously Hypertensive Rats (SHR): Implications for Cognitive Deficits in a Progressive Animal Model for Parkinson’s Disease.” *Behavioural Brain Research*.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113349>.
- LeWitt, P. A. 1989. “The Pharmacology of Levodopa in Treatment of Parkinson’s Disease: An Update.” In . https://doi.org/10.1007/978-3-642-73899-9_13.
- Lewitt, Peter A. 2015. “Levodopa Therapy for Parkinson’s Disease: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics.” *Movement Disorders*.
<https://doi.org/10.1002/mds.26082>.
- Li, L., and F. M. Zhou. 2013. “Parallel Dopamine D1 Receptor Activity Dependence of L-Dopa-Induced Normal Movement and Dyskinesia in Mice.” *Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.12.065>.
- Li, Y., T. Perry, M. S. Kindy, B. K. Harvey, D. Tweedie, H. W. Holloway, K. Powers, et al. 2009. “GLP-1 Receptor Stimulation Preserves Primary Cortical and Dopaminergic Neurons in Cellular and Rodent Models of Stroke and Parkinsonism.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (4): 1285–90. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806720106>.
- Lindestam Arlehamn, Cecilia S., Rekha Dhanwani, John Pham, Rebecca Kuan, April Frazier, Juliana Rezende Dutra, Elizabeth Phillips, et al. 2020. “ α -Synuclein-Specific T Cell Reactivity Is Associated with Preclinical and Early Parkinson’s Disease.” *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15626-w>.
- Lotharius, Julie, Laura L. Dugan, and Karen L. O’Malley. 1999. “Distinct Mechanisms Underlie Neurotoxin-Mediated Cell Death in Cultured Dopaminergic Neurons.” *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-04-01284.1999>.
- Luk, Kelvin C., Victoria Kehm, Jenna Carroll, Bin Zhang, Patrick O’Brien, John Q. Trojanowski, and Virginia M.Y. Lee. 2012. “Pathological α -Synuclein Transmission Initiates Parkinson-like Neurodegeneration in Nontransgenic Mice.” *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1227157>.

- Lundblad, M., B. Picconi, H. Lindgren, and M. A. Cenci. 2004. "A Model of L-DOPA-Induced Dyskinesia in 6-Hydroxydopamine Lesioned Mice: Relation to Motor and Cellular Parameters of Nigrostriatal Function." *Neurobiology of Disease*.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.01.007>.
- Macleod, Angus D., Kate S.M. Taylor, and Carl E. Counsell. 2014. "Mortality in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.25898>.
- Maneue, Yannick P., Ian J. Mitchell, Alan R. Crossman, and Jonathan M. Brotchiel. 1994. "On the Role of Enkephalin Cotransmission in the GABAergic Striatal Efferents to the Globus Pallidus." *Experimental Neurology*.
<https://doi.org/10.1006/exnr.1994.1007>.
- Martinez-Vicente, Marta, Zsolt Talloczy, Susmita Kaushik, Ashish C. Massey, Joseph Mazzulli, Eugene V. Mosharov, Roberto Hodara, et al. 2008. "Dopamine-Modified α -Synuclein Blocks Chaperone-Mediated Autophagy." *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI32806>.
- Matcovitch-Natan, Orit, Deborah R. Winter, Amir Giladi, Stephanie Vargas Aguilar, Amit Spinrad, Sandrine Sarrazin, Hila Ben-Yehuda, et al. 2016. "Microglia Development Follows a Stepwise Program to Regulate Brain Homeostasis." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aad8670>.
- McGeer, P. L., S. Itagaki, B. E. Boyes, and E. G. McGeer. 1988. "Reactive Microglia Are Positive for HLA-DR in the: Substantia Nigra of Parkinson's and Alzheimer's Disease Brains." *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/wnl.38.8.1285>.
- Michel, P. P., and F. Hefti. 1990. "Toxicity of 6-hydroxydopamine and Dopamine for Dopaminergic Neurons in Culture." *Journal of Neuroscience Research*.
<https://doi.org/10.1002/jnr.490260405>.
- Michel, Patrick P., Etienne C. Hirsch, and Stéphane Hunot. 2016. "Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease." *Neuron*.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.038>.
- Michel, Patrick P., Damien Toulorge, Serge Guerreiro, and Etienne C. Hirsch. 2013. "Specific Needs of Dopamine Neurons for Stimulation in Order to Survive: Implication for Parkinson Disease." *FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.12->

220418.

Misgeld, Thomas, and Thomas L. Schwarz. 2017. "Mitostasis in Neurons: Maintaining Mitochondria in an Extended Cellular Architecture." *Neuron*.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.055>.

Mittur, Aravind, Suneel Gupta, and Nishit B. Modi. 2017. "Pharmacokinetics of Rytary®, An Extended-Release Capsule Formulation of Carbidopa–Levodopa."

Clinical Pharmacokinetics. <https://doi.org/10.1007/s40262-017-0511-y>.

Monge-Fuentes, Victoria, Flávia Maria Medeiros Gomes, Gabriel Avohay Alves Campos, Juliana de Castro Silva, Andréia Mayer Biolchi, Lilian Carneiro dos Anjos, Jacqueline Coimbra Gonçalves, Kamila Soares Lopes, and Márcia Renata Mortari. 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): 31.

<https://doi.org/10.1186/s40409-015-0031-x>.

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, Márcia Renata, Alexandra Olimpio Siqueira Cunha, Luzitano Brandão Ferreira, and Wagner Ferreira dos Santos. 2007. "Neurotoxins from Invertebrates as Anticonvulsants: From Basic Research to Therapeutic Application."

Pharmacology and Therapeutics 114 (2): 171–83.

<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.01.009>.

Mortari, Márcia Renata, Alexandra Olimpio Siqueira Cunha, Luciana De Oliveira, Eveline Bis Vieira, Erica Aparecida Gelfuso, Joaquim Coutinho-Netto, and Wagner Ferreira Dos Santos. 2005. "Anticonvulsant and Behavioural Effects of the Denatured Venom of the Social Wasp *Polybia Occidentalis* (Polistinae, Vespidae)." *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 97 (5): 289–95.

https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto_137.x.

Ouchi, Yasuomi, Etsuji Yoshikawa, Yoshimoto Sekine, Masami Futatsubashi, Toshihiko Kanno, Tomomi Ogusu, and Tatsuo Torizuka. 2005. "Microglial

- Activation and Dopamine Terminal Loss in Early Parkinson's Disease." *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.20338>.
- Pacelli, Consiglia, Nicolas Giguère, Marie Josée Bourque, Martin Lévesque, Ruth S. Slack, and Louis Éric Trudeau. 2015. "Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons." *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.050>.
- Parillaud, Vincent R., Guillaume Lornet, Yann Monnet, Anne Laure Privat, Andrei T. Haddad, Vanessa Brochard, Amaury Bekaert, et al. 2017. "Analysis of Monocyte Infiltration in MPTP Mice Reveals That Microglial CX3CR1 Protects against Neurotoxic Over-Induction of Monocyte-Attracting CCL2 by Astrocytes." *Journal of Neuroinflammation*. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0830-9>.
- Paxinos, George, and Keith B J Franklin. 2004. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(03\)00088-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(03)00088-X).
- Pchitskaya, Ekaterina, Elena Popugaeva, and Ilya Bezprozvanny. 2018. "Calcium Signaling and Molecular Mechanisms Underlying Neurodegenerative Diseases." *Cell Calcium*. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.06.008>.
- Pennington, Michael W., Andrzej Czerwinski, and Raymond S. Norton. 2018. "Peptide Therapeutics from Venom: Current Status and Potential." *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.029>.
- Pennington, Susan, Kalyani Snell, Mark Lee, and Richard Walker. 2010. "The Cause of Death in Idiopathic Parkinson's Disease." *Parkinsonism and Related Disorders*. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2010.04.010>.
- Pessoa, Renata Ramina, Adriana Moro, Renato Puppi Munhoz, Hélio A.G. Teive, and Andrew J. Lees. 2018. "Apomorphine in the Treatment of Parkinson's Disease: A Review." *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. <https://doi.org/10.1590/0004-282x20180140>.
- Pilotto, Andrea, Sebastian Heinzl, Ulrike Suenkel, Stefanie Lerche, Kathrin Brockmann, Benjamin Roeben, Eva Schaeffer, et al. 2017. "Application of the Movement Disorder Society Prodromal Parkinson's Disease Research Criteria in 2 Independent Prospective Cohorts." *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.27035>.

- Poewe, Werner, Klaus Seppi, Caroline M. Tanner, Glenda M. Halliday, Patrik Brundin, Jens Volkmann, Anette Eleonore Schrag, and Anthony E. Lang. 2017. "Parkinson Disease." *Nature Reviews Disease Primers* 3: 1–21.
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>.
- Polymeropoulos, Mihael H., Christian Lavedan, Elisabeth Leroy, Susan E. Ide, Anindya Dehejia, Amalia Dutra, Brian Pike, et al. 1997. "Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease." *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>.
- Pondal, Margarita, Connie Marras, Janis Miyasaki, Elena Moro, Melissa J. Armstrong, Antonio P. Strafella, Binit B. Shah, et al. 2013. "Clinical Features of Dopamine Agonist Withdrawal Syndrome in a Movement Disorders Clinic." *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-302684>.
- Prinz, Marco, Josef Priller, Sangram S. Sisodia, and Richard M. Ransohoff. 2011. "Heterogeneity of CNS Myeloid Cells and Their Roles in Neurodegeneration." *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.2923>.
- Puopolo, Michelino, Elio Raviola, and Bruce P. Bean. 2007. "Roles of Subthreshold Calcium Current and Sodium Current in Spontaneous Firing of Mouse Midbrain Dopamine Neurons." *Journal of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4341-06.2007>.
- Qiu, Jing, Yan Wei Tan, Anna M. Hagenston, Marc Andre Martel, Niclas Kneisel, Paul A. Skehel, David J.A. Wyllie, Hilmar Bading, and Giles E. Hardingham. 2013. "Mitochondrial Calcium Uniporter Mcu Controls Excitotoxicity and Is Transcriptionally Repressed by Neuroprotective Nuclear Calcium Signals." *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms3034>.
- Rabinak, Christina A., and Melissa J. Nirenberg. 2010. "Dopamine Agonist Withdrawal Syndrome in Parkinson Disease." *Archives of Neurology*.
<https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.294>.
- Rittenhouse, Ann R., and Richard E. Zigmond. 1999. "Role of N- and L-Type Calcium Channels in Depolarization-Induced Activation of Tyrosine Hydroxylase and Release of Norepinephrine by Sympathetic Cell Bodies and Nerve Terminals."

Journal of Neurobiology. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(199908\)40:2<137::AID-NEU1>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199908)40:2<137::AID-NEU1>3.0.CO;2-A).

Rivero-Ríos, Pilar, Patricia Gómez-Suaga, Elena Fdez, and Sabine Hilfiker. 2014. “Upstream Deregulation of Calcium Signaling in Parkinson’s Disease.” *Frontiers in Molecular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00053>.

Robertson, G. S., and H. A. Robertson. 1989. “Evidence That L-Dopa-Induced Rotational Behavior Is Dependent on Both Striatal and Nigral Mechanisms.” *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.09-09-03326.1989>.

Romo, R., and W. Schultz. 1990. “Dopamine Neurons of the Monkey Midbrain: Contingencies of Responses to Active Touch during Self-Initiated Arm Movements.” *Journal of Neurophysiology*. <https://doi.org/10.1152/jn.1990.63.3.592>.

Rovere, Rita M.L. La, Gemma Roest, Geert Bultynck, and Jan B. Parys. 2016. “Intracellular Ca²⁺ Signaling and Ca²⁺ Microdomains in the Control of Cell Survival, Apoptosis and Autophagy.” *Cell Calcium* 60 (2): 74–87. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.04.005>.

Sanchez-Guajardo, Vanesa, Fabia Febbraro, Deniz Kirik, and Marina Romero-Ramos. 2010. “Microglia Acquire Distinct Activation Profiles Depending on the Degree of α -Synuclein Neuropathology in a RAAV Based Model of Parkinson’s Disease.” *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008784>.

Santos, José R., João A.S. Cunha, Aline L. Dierschnabel, Clarissa L.C. Campêlo, Anderson H.F.F. Leão, Anatildes F. Silva, Rovena C.G.J. Engelberth, et al. 2013. “Cognitive, Motor and Tyrosine Hydroxylase Temporal Impairment in a Model of Parkinsonism Induced by Reserpine.” *Behavioural Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.06.031>.

Sauer, H., and W. H. Oertel. 1994. “Progressive Degeneration of Nigrostriatal Dopamine Neurons Following Intrastratial Terminal Lesions with 6-Hydroxydopamine: A Combined Retrograde Tracing and Immunocytochemical Study in the Rat.” *Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90605-X](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90605-X).

Scarffe, Leslie A., Daniel A. Stevens, Valina L. Dawson, and Ted M. Dawson. 2014. “Parkin and PINK1: Much More than Mitophagy.” *Trends in Neurosciences*.

<https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.03.004>.

Schapira, A. H.V., J. M. Cooper, D. Dexter, P. Jenner, J. B. Clark, and C. D. Marsden. 1989. "MITOCHONDRIAL COMPLEX I DEFICIENCY IN PARKINSON'S DISEASE." *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)92366-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(89)92366-0).

Schwartz, M. F. 2020. Desenho racional de peptídeos antiepilépticos bioinspirados na occidentalina visando a otimização de seu perfil farmacocinético. *Tese (Mestrado em Ciências da Saúde)*. Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro

Sidransky, E., M.A. Nalls, J.O. Aasly, J. Aharon-Peretz, G. Annesi, E.R. Barbosa, A. Bar-Shira, et al. 2009. "Multicenter Analysis of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson's Disease." *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0901281>.

Silva, Juliana, Victoria Monge-Fuentes, Flávia Gomes, Kamila Lopes, Lilian dos Anjos, Gabriel Campos, Claudia Arenas, et al. 2015. "Pharmacological Alternatives for the Treatment of Neurodegenerative Disorders: Wasp and Bee Venoms and Their Components as New Neuroactive Tools." *Toxins* 7 (8): 3179–3209. <https://doi.org/10.3390/toxins7083179>.

Silveira, C. R.A., J. MacKinley, K. Coleman, Z. Li, E. Finger, R. Bartha, S. A. Morrow, et al. 2019. "Ambroxol as a Novel Disease-Modifying Treatment for Parkinson's Disease Dementia: Protocol for a Single-Centre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial." *BMC Neurology*. <https://doi.org/10.1186/s12883-019-1252-3>.

Simola, Nicola, Micaela Morelli, and Anna R. Carta. 2007. "The 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease." *Neurotoxicity Research*. <https://doi.org/10.1007/BF03033565>.

Smith, Charles G., and John R. Vane. 2003. "The Discovery of Captopril." *The FASEB Journal* 17 (8): 788–89. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0093life>.


Sommer, Annika, Franz Maxreiter, Florian Krach, Tanja Fadler, Janina Grosch, Michele Maroni, Daniela Graef, et al. 2018. "Th17 Lymphocytes Induce Neuronal Cell Death in a Human iPSC-Based Model of Parkinson's Disease." *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.06.015>.

- Spinelli, Jessica B., and Marcia C. Haigis. 2018. "The Multifaceted Contributions of Mitochondria to Cellular Metabolism." *Nature Cell Biology*.
<https://doi.org/10.1038/s41556-018-0124-1>.
- Stefanis, Leonidas. 2012. "α-Synuclein in Parkinson's Disease." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>.
- Stoyka, Lindsay E., Andrew E. Arrant, Drake R. Thrasher, Dreson L. Russell, Jennifer Freire, Casey L. Mahoney, Ashwin Narayanan, Aseel G. Dib, David G. Standaert, and Laura A. Volpicelli-Daley. 2020. "Behavioral Defects Associated with Amygdala and Cortical Dysfunction in Mice with Seeded α-Synuclein Inclusions." *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104708>.
- Sulzer, David, Roy N. Alcalay, Francesca Garretti, Lucien Cote, Ellen Kanter, Julian Agin-Liebes, Christopher Liong, et al. 2017. "T Cells from Patients with Parkinson's Disease Recognize α-Synuclein Peptides." *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/nature22815>.
- Sulzer, David, and D. James Surmeier. 2013. "Neuronal Vulnerability, Pathogenesis, and Parkinson's Disease." *Movement Disorders*.
<https://doi.org/10.1002/mds.25095>.
- Surmeier, D. James, José A. Obeso, and Glenda M. Halliday. 2017. "Selective Neuronal Vulnerability in Parkinson Disease." *Nature Reviews Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2016.178>.
- Surmeier, D. James, Paul T. Schumacker, Jaime D. Guzman, Ema Ilijic, Ben Yang, and Enrico Zampese. 2017. "Calcium and Parkinson's Disease." *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.168>.
- Tang, Daoqi, Hong Tian, Jicheng Wu, Jiexiao Cheng, Cheng Luo, Wenbo Sai, Xiaoda Song, Xiangdong Gao, and Wenbing Yao. 2018. "C-Terminal Site-Specific PEGylated Exendin-4 Analog: A Long-Acting Glucagon like Peptide-1 Receptor Agonist, on Glycemic Control and Beta Cell Function in Diabetic Db/Db Mice." *Journal of Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2018.08.009>.
- Tanner, Caroline M., Freya Kame, G. Webster Ross, Jane A. Hoppin, Samuel M. Goldman, Monica Korell, Connie Marras, et al. 2011. "Rotenone, Paraquat, and


- Parkinson's Disease." *Environmental Health Perspectives*.
<https://doi.org/10.1289/ehp.1002839>.
- Tansey, Malú G., and Marina Romero-Ramos. 2019. "Immune System Responses in Parkinson's Disease: Early and Dynamic." *European Journal of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1111/ejn.14290>.
- Theodore, Shaji, Shuwen Cao, Pamela J. McLean, and David G. Standaert. 2008. "Targeted Overexpression of Human α -Synuclein Triggers Microglial Activation and an Adaptive Immune Response in a Mouse Model of Parkinson Disease." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*.
<https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31818e5e99>.
- Thiele, Sherri L., Ruth Warre, and Joanne E. Nash. 2012. "Development of a Unilaterally-Lesioned 6-OHDA Mouse Model of Parkinson's Disease." *Journal of Visualized Experiments*. <https://doi.org/10.3791/3234>.
- Toth, Anna B., Andrew K. Shum, and Murali Prakriya. 2016. "Regulation of Neurogenesis by Calcium Signaling." *Cell Calcium*.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.02.011>.
- Turcano, Pierpaolo, Michelle M. Mielke, James H. Bower, Joseph E. Parisi, Jeremy K. Cutsforth-Gregory, J. Eric Ahlskog, and Rodolfo Savica. 2018. "Levodopa-Induced Dyskinesia in Parkinson Disease A Population-Based Cohort Study." *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006643>.
- Ungerstedt, Urban. 1968. "6-Hydroxy-Dopamine Induced Degeneration of Central Monoamine Neurons." *European Journal of Pharmacology*.
[https://doi.org/10.1016/0014-2999\(68\)90164-7](https://doi.org/10.1016/0014-2999(68)90164-7).
- Ungerstedt, Urban, and Gordon W. Arbuthnott. 1970. "Quantitative Recording of Rotational Behavior in Rats after 6-Hydroxy-Dopamine Lesions of the Nigrostriatal Dopamine System." *Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(70\)90187-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(70)90187-3).
- Valente, Eriza Maria, Patrick M. Abou-Sleiman, Viviana Caputo, Miratul M.K. Muqit, Kirsten Harvey, Suzana Gispert, Zeeshan Ali, et al. 2004. "Hereditary Early-Onset Parkinson's Disease Caused by Mutations in PINK1." *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.1096284>.

- Volpicelli-Daley, Laura A., Hisham Abdelmotilib, Zhiyong Liu, Lindsay Stoyka, João Paulo Lima Daher, Austen J. Milnerwood, Vivek K. Unni, et al. 2016. "G2019s-LRRK2 Expression Augments α -Synuclein Sequestration into Inclusions in Neurons." *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3642-15.2016>.
- Wang, Libo, Jia Li, and Jiajun Chen. 2018. "Levodopa-Carbidopa Intestinal Gel in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Frontiers in Neurology*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00620>.
- Wang, Wei, Iva Perovic, Johnathan Chittuluru, Alice Kaganovich, Linh T.T. Nguyen, Jingling Liao, Jared R. Auclair, et al. 2011. "A Soluble α -Synuclein Construct Forms a Dynamic Tetramer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113260108>.
- Weinhard, Laetitia, Giulia Di Bartolomei, Giulia Bolasco, Pedro Machado, Nicole L. Schieber, Urte Neniskyte, Melanie Exiga, et al. 2018. "Microglia Remodel Synapses by Presynaptic Trogocytosis and Spine Head Filopodia Induction." *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03566-5>.
- Weintraub, Daniel, Claire Chiang, Hyungjin Myra Kim, Jayne Wilkinson, Connie Marras, Barbara Stanislawski, Eugenia Mamikonyan, and Helen C. Kales. 2016. "Association of Antipsychotic Use with Mortality Risk in Patients with Parkinson Disease." *JAMA Neurology*. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.0031>.
- Wirdefeldt, Karin, Per Odin, and Dag Nyholm. 2016. "Levodopa-Carbidopa Intestinal Gel in Patients with Parkinson's Disease: A Systematic Review." *CNS Drugs*. <https://doi.org/10.1007/s40263-016-0336-5>.
- Yun, Seung Pil, Tae In Kam, Nikhil Panicker, Sangmin Kim, Yumin Oh, Jong Sung Park, Seung Hwan Kwon, et al. 2018. "Block of A1 Astrocyte Conversion by Microglia Is Neuroprotective in Models of Parkinson's Disease." *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0051-5>.
- Zecca, L., D. Tampellini, M. Gerlach, P. Riederer, R. G. Fariello, and D. Sulzer. 2001. "Substantia Nigra Neuromelanin: Structure, Synthesis, and Molecular Behaviour." *Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology*. <https://doi.org/10.1136/mp.54.6.414>.


Anexos
Anexo 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 Rólo
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.