

RONALDO COELHO SILVA

**NOVOS FÁRMACOS NEUROPROTETORES PARA A DOENÇA DE
PARKINSON: PEPTÍDEOS ISOLADOS DA PEÇONHA DE VESPAS SOCIAIS
LIVRES E ASSOCIADOS A NANOFORMULAÇÕES**

BRASÍLIA, 2024

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

RONALDO COELHO SILVA

**NOVOS FÁRMACOS NEUROPROTETORES PARA A DOENÇA DE
PARKINSON: PEPTÍDEOS ISOLADOS DA PEÇONHA DE VESPAS SOCIAIS
LIVRES E ASSOCIADOS A NANOFORMULAÇÕES**

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior
Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Renata Mortari

BRASÍLIA, 2024

RONALDO COELHO SILVA

**NOVOS FÁRMACOS NEUROPROTETORES PARA A DOENÇA DE
PARKINSON: PEPTÍDEOS ISOLADOS DA PEÇONHA DE VESPAS SOCIAIS
LIVRES E ASSOCIADOS A NANOFORMULAÇÕES**

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 27 de agosto de 2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior (Presidente)
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Djane Braz Duarte
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Cristina Aparecida Jark Stern
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Prof. Dr. Sergio Henrique de Souza Alves
Centro Universitário de Brasília (UniCEUB)

Prof. Dr. Vitor Augusto Motta Moreira
Universidade de Brasília (Suplente)

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília pela oportunidade de realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A minha esposa querida Leiziane Araújo Coelho Barros, que sempre me deu amparo e conforto nos momentos mais desafiadores dessa jornada acadêmica. Te amo Zizi! Aos meus pais, Adão Gomes da Silva e Pedra Coelho Silva, por me guiarem ao longo da vida e me incentivarem a alcançar meus objetivos com perseverança. Aos meus irmãos Ricardo Coelho Silva, e Valéria Coelho Silva, pelo carinho e afeto.

Aos amigos que de forma direta, ou indireta me deram apoio para a realização deste estudo, em especial ao amigo Antônio do Nascimento Mendonça Filho, que me ajudou na confecção do aparato inicial e por sua incessante boa vontade em todos os momentos desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Fábio Viegas Caixeta, pelas conversas motivacionais e animadoras, por sua inestimável contribuição na montagem do aparato inicial, além dos vários ensinamentos na utilização de equipamentos que precisei utilizar.

Ao Prof. Dr. Jair Trapé Goulart, pela ajuda na montagem do aparato inicial de recompensa. Ao Tec. do Lab. Dr. Danilo Gustavo R. de Oliveira, pela ajuda incomensurável na preparação e análise imunohistoquímica.

As colegas de departamento e pesquisa Maria Camila Acero Castilho e Aline Caron Borges, pelo apoio que deram ao trabalho em diversos momentos.

Ao aluno de graduação Miguel M. Tavares, e aluna de doutorado Rayanne Polleti Guimarães, pela ajuda inicial com as cirurgias e os tratamentos.

Aos colegas de laboratório e doutorado, Francisca Valéria Bezerra Sampaio Marques e Miguel Cezar Merino Ruiz, pelo apoio e ajuda na rotina de experimentos durante a minha estadia no laboratório.

A minha Coorientadora Profa. Dra. Márcia Renata Mortari, por ter me cedido este projeto para dar andamento, por todos os ensinamentos, pelo entusiasmo e amor a Neurociência que sempre me inspiraram. Obrigado por esta oportunidade!

Por fim, ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior, que me guiou e aconselhou ao longo desses quase oito anos de estudo e pesquisa. Sua paciência, seriedade, e dedicação a vida acadêmica foram características que me estimularam e me ajudaram a seguir firme nos desafios enfrentados durante todo este período.

“É precisamente na fronteira do conhecimento que a imaginação tem seu papel mais importante; o que ontem foi apenas um sonho, amanhã poderá se tornar realidade.”

Marcelo Gleiser

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa com enormes prejuízos sociais e psicológicos na vida dos afetados. As causas do aparecimento da doença ainda permanecem sem total esclarecimento, uma vez que a enfermidade apresenta componentes multifatoriais. As principais características fisiopatológicas da DP são a degeneração de neurônios dopaminérgicos dos Núcleos da Base, em especial a Substância Negra (SN) e a presença de corpos de inclusão eosinófilos no citoplasma dos neurônios, conhecidos como corpos de Lewy. A ausência de medicamentos aprovados em humanos capaz de alterar a evolução da enfermidade, além dos efeitos adversos associados aos tratamentos convencionais existentes, resulta em uma urgência no desenvolvimento de novas estratégias no estudo da doença quanto em tratamentos mais eficazes que possibilitem modificar o curso da patologia. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade neuroprotetora do peptídeo sintético Neurovespina (um análogo bioinspirado do peptídeo isolado de vespa social) em sua forma livre e associado a nanotecnologia, no modelo murino da Doença de Parkinson induzido por injeção unilateral intraestriatal da neurotoxina 6-OHDA. O protocolo experimental foi desenvolvido durante 8 dias, onde os grupos receberam via subcutânea, o peptídeo na sua forma livre; ou o peptídeo nanoencapsulado; ou salina como tratamento. Os efeitos do comprometimento motor e de assimetria dos membros foram avaliados em 3 dias alternados de ensaios, utilizando o teste do RotaRod e o teste do cilindro. Após os ensaios comportamentais, os animais foram eutanasiados e as alterações neuronais analisadas por meio da contagem de neurônios imuno-marcados com anti-tirosina hidroxilase (anti-TH) e inspeção da Densidade Ótica estriatal. Os resultados deste trabalho indicam e corroboram a ação neuroprotetora do peptídeo sintético Neurovespina (em sua forma livre) nos neurônios dopaminérgicos da SN, após a lesão intraestriatal de 6-OHDA. Além disso, sugerem que sua associação com um nanossistema tem potencial para otimizar sua biodisponibilidade no SNC e se estabelecer como fármaco modelo para o desenvolvimento de novas moléculas neuroativas no estudo da DP.

Palavras-Chave (português):

Doença de Parkinson; Neurovespina; nanotecnologia; 6-OHDA; neurodegeneração

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative pathology with enormous social and psychological losses in the lives of those affected. The causes of the onset of the disease still remain unclear, as the disease has multifactorial components. The main pathophysiological characteristics of the disease are the degeneration of dopaminergic neurons in the Basal Nuclei, especially the Substantia Nigra (SN) and the presence of eosinophilic inclusion bodies in the cytoplasm of neurons, known as Lewy bodies. The absence of approved medicines in humans capable of altering the evolution of the disease, in addition to the adverse effects associated with existing conventional treatments, results in an urgency in the development of new strategies to study the disease and more effective treatments that make it possible to modify the course of the pathology. The present work aimed to evaluate the neuroprotective activity of the synthetic peptide Neurovespina (an analogue of the peptide isolated from social wasps) in its free form and associated with nanotechnology, in the murine model of Parkinson's Disease by unilateral intrastriatal injection of the neurotoxin 6-OHDA. The experimental protocol was developed over 8 days, where the groups received subcutaneously the peptide in its free form; or the nanoencapsulated peptide; or saline (all via s.c.) as a treatment. The effects of motor impairment and limb asymmetry were evaluated in 3 alternating days of testing, using the RotaRod test and the cylinder test. After the behavioral tests, the animals were euthanized and neuronal changes were analyzed by counting neurons immunostained with anti-tyrosine hydroxylase (anti-TH) and inspection of striatal Optical Density. The results of this work indicate and corroborate the neuroprotective action of the synthetic peptide Neurovespin (in its free form) on SN dopaminergic neurons after intrastriatal 6-OHDA injury. Furthermore, they suggest that its association with a nanosystem has the potential to optimize its bioavailability in the CNS and establish itself as a model drug for the development of new neuroactive molecules in the study of PD.

Palavras-Chave (inglês): Parkinson's disease; Neurovespina; nanotechnology; 6-OHDA; neurodegeneration

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ilustração representando as três vias de retroalimentação. A via hiperdireta (córtex – NST - GPi/SNr –Tálamo); via indireta (córtex – estriado – Gpe - NST- GPi/ SNr – Tálamo); e pela via direta (organizado em córtex – estriado - GPi/SNr e SNpc). As setas verdes correspondem às projeções excitatórias glutamatérgicas (Glu) e as setas pontilhadas compreendem as projeções inibitórias GABAérgicas (GABA). Adaptado de Nambu et al(33). (2005). 17
- Figura 2 - Fórmula estrutural do peptídeo Neurovespina. Massa molecular de 1208,53 Da e nove resíduos de aminoácidos: PyrE-Q-M-W-A-V-F-W-M-NH₂. Retirado de Campos(58), (2016). 21
- Figura 3 - Ilustração representativa de alguns exemplos de sistemas de entrega de fármacos baseados em nanotecnologia. Retirado de Lima LS & Mortari MR(72), 2021 (com adaptações). 22
- Figura 4 - Cirurgia estereotáxica em um sujeito do experimento. O círculo na imagem apresenta o alinhamento da agulha em relação ao bregma para a realização das medidas estereotáxicas. 26
- Figura 5 - Desenho experimental evidenciando as etapas do trabalho e o regime de tratamento utilizado. 28
- Figura 6 - Equação utilizada para calcular o percentual de assimetria geral dos sujeitos no teste do cilindro. Retirado de Woodle et al (81). 31
- Figura 7 - Equação utilizada para calcular o percentual de uso de ambos os membros. . Retirado de Sharllet T, Tillerson JL (85). 31
- Figura 8 - Exemplo de neurônios THr, em aumento de 400x, definido com viável para contagem de células. Barra de escala em 20µm. 33
- Figura 9 - Avaliação do comprometimento motor em termos da latência de queda (% em relação ao máximo) no pré-teste, e nos 3 dias do ensaio após a cirurgia (D0). Análise estatística feita por ANOVA de duas vias com pós-teste de Dunnett.

Resultados expressos como média \pm EPM. Diferenças significativas em comparação com o Controle lesão. Sham: ++++= $p < 0,0001$; Neurovespina: *= $p < 0,001$. Diferença significativa em comparação com o grupo Sham. NANONEuro: # = $p < 0,05$ 36

Figura 10 - Análise do tempo médio de latência de queda (% em relação ao tempo máximo) nos quatro grupos experimentais do trabalho. Análise estatística feita por “one-way” ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. Resultados expressos como média \pm EPM. Diferença estatística significativa em comparação com o controle lesão. * $p = 0,0012$ 37

Figura 11 - Análise comparativa entre os coeficientes de assimetria nos quatro grupos experimentais do trabalho. Análise estatística feita pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Resultados expressos como média \pm EPM. Não foi encontrada diferença estatística significativa entre os grupos. 37

Figura 12 - Avaliação do percentual de toques na parede do cilindro utilizando ambos os membros simultaneamente. Análise estatística feita por “one-way” ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. Resultados expressos como média \pm EPM. Diferenças significativas em comparação com o grupo Sham. Controle lesão (+): $p = 0,0097$; Neurovespina (*): $p = 0,0313$; NANONEuro (#): $p = 0,0035$ 38

Figura 13 - Comparação entre a quantidade de neurônios THr na VTA+SNPc do lado ipsilateral (lesionado) e lado contralateral (sadio) do encéfalo, em cada grupo experimental. Análise estatística feita por ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. Resultados expressos como média \pm EPM. * $p = 0,0094$; ** $p = 0,0018$. .. 39

Figura 14 - Avaliação da porcentagem de neurônios THr remanescentes na VTA+SNPc em relação ao lado contralateral do hemisfério (sadio) dos grupos de tratamento avaliados. Análise estatística por Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn. Resultados expressos como média \pm EPM. Diferença estatística significativa em comparação com o grupo sham. * $p = 0,0193$; ** $p = 0,0018$ 39

Figura 15 - Comparação entre a quantidade de neurônios THr na SNpc do lado ipsilateral (lesionado) e lado contralateral (sadio) do encéfalo, em cada grupo experimental. Análise estatística feita por ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni Resultados expressos como média \pm EPM. * $p = 0,0001$; ** $p = 0,0020$... 40

Figura 16 - Avaliação da porcentagem de neurônios THr remanescentes na SNpc, em relação ao lado contralateral do hemisfério (sadio), dos grupos de tratamento avaliados. Análise estatística por Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn. Resultados expressos como média \pm EPM. Diferença estatística significativa em comparação com o grupo sham. * $p=0,0257$; ** $p=0,0033$ 41

Figura 17 – Fotomicrografia das secções coronais representativas da região da Substância Negra e da VTA com imunomarcção de anti-tirosina hidroxilase (anti-TH) para cada um dos grupos experimentais. Na esquerda encontra-se o lado ipsilateral à lesão (lesionado), e o lado contralateral à lesão (sadio) à direita. Escala de 500 μ m. Distância relativa ao bregma -3.07mm..... 42

Figura 18 - Avaliação da porcentagem de densidade ótica estriatal em relação ao lado contralateral. Análise estatística por Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn. Resultados expressos como média \pm EPM. Diferença significativa em comparação com o grupo controle Lesão. * $p<0,05$ 44

Figura 19 - Secção coronal ilustrativa evidenciando a área utilizada (pontilhado em amarelo) para quantificação de densidade ótica do estriado (à esquerda), e desenho baseado no atlas de estereotaxia com delimitações das principais estruturas que foram utilizadas como parâmetros para delimitações do STR (à direita). Acb = núcleo acumbens; aca = comissura anterior; cc = corpo caloso; CPu (STR) = caudato putâmen (estriado); Cx = córtex cerebral; LV = ventrículo lateral. 44

Figura 20 - Fotomicrografia das secções coronais representativas da fribas estriatais marcadas com anti-TH utilizadas para análise da densidade ótica em cada um dos grupos experimentais. Na esquerda encontra-se o lado ipsilateral à lesão (lesionado), e o lado contralateral à lesão (sadio) à direita. Escala de 500 μ m. Distância relativa ao bregma 0.61mm. Imagem transformada para escala de cinza através do software ImageJ. 45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Compostos administrados por via intraestriatal ou por via subcutânea (tratamento) de acordo com cada grupo experimental.	28
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA	6-Hidroxidopamina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CL	Corpúsculos de Lewy
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
D ₁	Receptor de dopamina do tipo 1
D ₂	Receptor de dopamina do tipo 2
DP	Doença de Parkinson
GABA	ácido gama-aminobutírico
Glu	Glutamato
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
NB	Núcleos da Base
NSt	Núcleo subtalâmico
SN	Substância Negra
SNC	Sistema Nervoso Central
SNpc	Substância Negra <i>pars compacta</i>
SNr	Substância Negra <i>pars reticulata</i>
TH	Tirosina Hidroxilase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 DOENÇA DE PARKINSON	14
1.2 NEUROQUÍMICA DA DOENÇA DE PARKINSON	15
1.3 MODELO ANIMAIS E BIOQUÍMICOS NO ESTUDO DA DP	18
1.4 NEUROVESPINA E SEU POTENCIAL FARMACOLÓGICO	20
1.5 NANOTECNOLOGIA NA ENTREGA DE FÁRMACOS	21
2 OBJETIVO GERAL	24
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 MÉTODO	25
3.1 BIOENSAIOS	25
3.2 NEUROCIRURGIA	25
3.3 CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS	26
3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	27
3.5 PREPARO DO PEPTÍDEO E NANOSSISTEMA	29
3.6 COMPROMETIMENTO MOTOR	29
3.6.1 Teste de performance motora	29
3.6.2 Teste de assimetria	30
3.7 EUTANÁSIA E SECÇÃO CEREBRAL	31
3.8 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA	32
3.9 ANÁLISE DE DADOS	34
4 RESULTADOS	35
4.1 AVALIAÇÃO DO COMPROMETIMENTO MOTOR	35
4.2 AVALIAÇÃO DA ASSIMETRIA	37
4.3 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE NEURÔNIOS	38
4.4 DENSITOMETRIA DE TERMINAIS TH+ NO ESTRIADO	43
5 DISCUSSÃO	46
6 CONCLUSÃO	52
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO CEUA – UnB	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

O aumento da expectativa de vida da população aumenta a ocorrência das doenças que acometem idosos, como por exemplo, a Doença de Parkinson (DP) e tais doenças necessitam de atenção (1). Ela é a segunda patologia neurodegenerativa mais comum no mundo e sua incidência e prevalência aumentam de acordo com a idade (2–4).

Dez milhões de pessoas são diagnosticadas com a DP no mundo, e no Brasil, estima-se que a doença atinja 250 mil idosos, tendo uma incidência anual de 36 mil novos casos, segundo o IBGE. No geral, apenas 5% dos casos tem natureza hereditária e sua manifestação acomete indivíduos com idade média de 55 anos, afetando 1% da população com mais de 50 anos. A incidência é muito baixa em sujeitos com menos de 40 anos, porém aumenta para 2% após os 65 anos de idade(5). Além disso, acredita-se que futuramente o Brasil será o quinto país com maior número de acometidos por essa doença(6–8).

A DP é uma doença neurodegenerativa de etiologia idiopática com causas ainda indefinidas(9), e afeta o estado físico, social e funcional dos indivíduos acometidos(10). Os distúrbios motores iniciais foram relatados por James Parkinson em 1817, em seu trabalho “*An essay on the shaking palsy*”(11). Ele a descreveu como a “paralisia agitante”, sendo caracterizada por perda da iniciação dos movimentos (bradicinesia), perda da expressão (face mascarada), alteração no tom da fala, instabilidade postural, tremor de repouso e rigidez(12–14).

O tremor de repouso é o sinal mais característico e visível da patologia, caracterizando-se por movimentos trêmulos, que podem ser desencadeados em qualquer membro do corpo (além da cabeça) quando o paciente se encontra parado, como membros inferiores e superiores, o tronco ou os lábios. Nos membros, o tremor geralmente apresenta-se com pronação e supinação do antebraço, e flexão e extensão dos dedos(15). Além disso, a rigidez apresentada é caracterizada por uma maior resistência da amplitude do movimento, levando o indivíduo a adquirir uma postura curvada. Já a instabilidade postural (alteração no equilíbrio) surge em estágios mais avançados da patologia, e acredita-se que esse sinal aumente de intensidade devido ao comprometimento de regiões mais específicas do Sistema

Nervoso Central (SNC) como o córtex, os núcleos da base e o cerebelo, uma vez que eles têm papel crucial no controle motor(12).

Existe também a presença de sinais não motores, e suas manifestações podem ser distintas, como distúrbios autonômicos e depressão(16), distúrbios do sono, demência e disfunção cognitiva(17). Além disso, outras alterações podem estar presentes na fase prodrômica da doença, como problemas olfativos, problemas oculares e constipação(14).

A prevalência e a incidência são maiores entre sujeitos do sexo masculino do que em indivíduos do sexo feminino, possivelmente ocasionada por uma ação protetora do estrogênio nas mulheres(18). Análises em animais de experimentação corroboram esse argumento, relatados em trabalhos que descreveram uma atividade neuroprotetora desse hormônio em modelos animais da DP induzidos por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), sendo descritas como uma possível terapia e tratamento para sujeitos do sexo masculino(19).

As hipóteses da origem da DP são diversas, porém, a grande maioria dos trabalhos relata que a causa possivelmente seja multifatorial, sendo resultado da ação de neurotoxinas do ambiente, anormalidades mitocondriais, produção de radicais livres, predisposição genética e envelhecimento cerebral(20,21).

1.2 NEUROQUÍMICA DA DOENÇA DE PARKINSON

Bioquimicamente, a doença é caracterizada pela perda dopaminérgica causada pela degeneração de células produtoras da dopamina em regiões dos núcleos da base (NB), constituída por um grupo de regiões subcorticais interligadas e situadas na região do mesencéfalo. Esses grupos são geralmente divididos em: (1) Estriado, que constituem juntamente o Núcleo Caudado e o Putâmen; (2) o Globo Pálido, o qual é dividido em externo (GPe) e o interno (GPi); o Núcleo Subtalâmico (NST); e a Substância Negra (SN), composta pela região *pars compacta* (SNpc) e pela região *pars reticulata* (SNpr)(22). Nesse sentido, a região da SNpc, se destaca com alta despigmentação, assim como a presença de Corpúsculos de Lewy (CL), que são inclusões intraneuronais, redondas, eosinofílicas, com um núcleo hialino e um halo periférico pálido, compostos por mais de 90 proteínas, sendo os seus

principais componentes a alfa-sinucleína(23,24). Assim, a alfa-sinucleína se acumula formando agregados filamentosos, que podem ativar diretamente a micróglia, através da expressão de um subconjunto de receptores com padrões de reconhecimento específicos, levando à um processo neuroinflamatório e de degeneração neural(25–28).

As informações responsáveis pelo controle dos movimentos são originadas no córtex e processadas nos NB, que por sua vez retornam para o córtex através do tálamo. Esse circuito controla a atividade motora por meio da regulação de impulsos neurais que facilitam sua atividade tônica, auxiliando o planejamento e a execução de movimentos sequenciados como, por exemplo, a marcha humana(29). Como consequência, a ação dos NB sobre as suas conexões alvo são geralmente inibitórias, e este circuito é estruturado por três principais sistemas de retroalimentação com vias morfológica e bioquimicamente e distintas, conhecidas como: via direta; via indireta; e hiperdireta, com ações opostas e responsáveis pela modulação e refinamento do controle motor(30,31).

Todas as vias recebem impulsos excitatórios oriundos diretamente de áreas corticais que convergem para dois importantes núcleos, o GPi e a SNr. Este circuito inclui projeções excitatórias glutamatérgicas (Glu) a partir do córtex para o estriado, que em seguida envia projeções inibitórias GABAérgicas (ácido gama-aminobutírico; GABA) para o tálamo(32)(figura 1).

A via direta expressa os receptores de dopamina do tipo D₁ e é modulada por neurônios GABAérgicos oriundos do estriado e apresentam projeções monossinápticas, que se projetam para os núcleos GPi e SNr. A via indireta, expressa os receptores de dopamina do tipo D₂ e é modulada por neurônios GABAérgicos estriatais e projeções polissinápticas que convergem para o GPi e SNr, porém, percorrendo um caminho mais longo ao passar por outros dois núcleos, o GPe e o NST(33). O NST recebe entradas somatotopicamente oriundas diretamente de áreas corticais motoras, como o córtex motor primário e o córtex pré-motor. A velocidade de condução neural procedente da via córtico-NST-GPi/SNr também denominada como via hiperdireta torna-se mais rápida que nas vias direta e indireta(34).

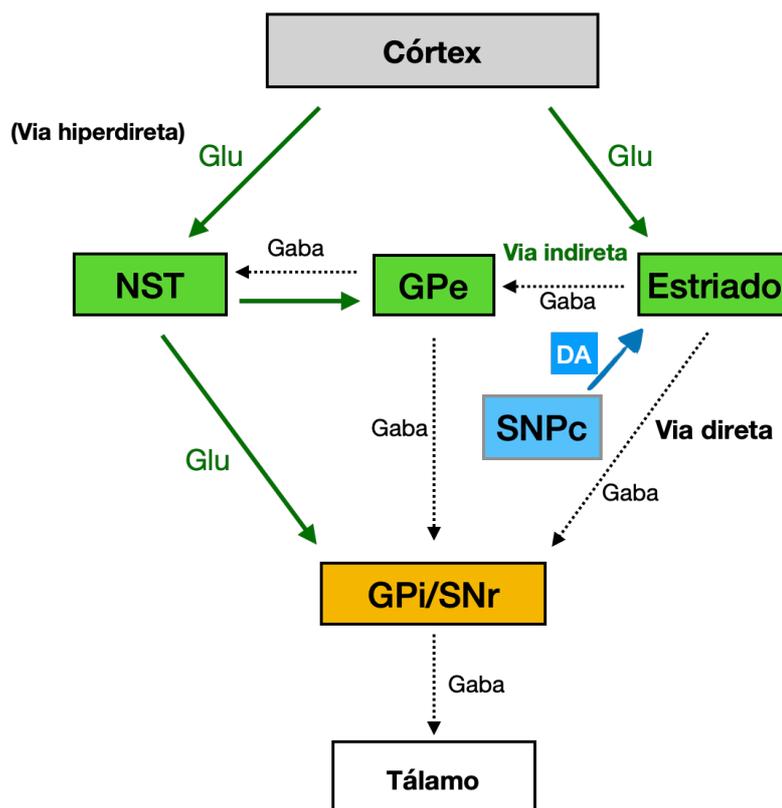


Figura 1 - Ilustração representando as três vias de retroalimentação. A via hiperdireta (córtex – NST - GPi/SNr –Tálamo); via indireta (córtex – estriado – Gpe - NST- GPi/ SNr – Tálamo); e pela via direta (organizado em córtex – estriado - GPi/SNr e SNpc). As setas verdes correspondem às projeções excitatórias glutamatérgicas (Glu); as setas pontilhadas compreendem as projeções inibitórias GABAérgicas (GABA); e as setas azuis correspondem às projeções dopaminérgicas enviadas da Substância Negra *pars compacta* para o corpo estriado. Adaptado de Nambu et al(33). (2005).

Na DP, ocorrem alterações na atividade das regiões do tálamo e do córtex motor, em que o aumento dos sinais excitatórios pela via hiperdireta e inibitórios pela via indireta, além da redução dos sinais inibitórios da via direta, resultam em uma desinibição reduzida no tálamo e no córtex, ocasionando em alterações motoras como a acinesia. Portanto, a integração das vias direta, indireta e hiperdireta controlam dinamicamente a atividade do tálamo e do córtex para o refinamento e seleção do controle motor(33).

Neurônios que possuem altos níveis de dopamina são proeminentes nas regiões mesencefálicas, em especial na SN. Alguns dos axônios desses neurônios terminam no corpo estriado, que recebe também a entrada massiva de neurônios excitatórios advindos de áreas corticais e em especial dos núcleos do tálamo, onde participam do controle dos movimentos complexos(35). Assim, a fisiopatologia de

perturbações ocorridas nos NB, como ocorre nas desordens neurodegenerativas, podem ser elucidadas pelo aumento ou diminuição da inibição das regiões do tálamo e do córtex(36). Como consequência, no circuito motor, a ação dos NB sobre as suas conexões alvos é geralmente inibitória e a partir daí, as vias diretas e indiretas com ações opostas são as responsáveis pela modulação e pelo refinamento do controle motor(37).

Dessa forma, é possível observar que a patologia altera de forma incisiva as vias dopaminérgicas induzindo os sintomas motores clássicos da doença, incluindo: tremor, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural; estabelecendo os sinais motores clássicos da doença(23). Porém, há também a presença dos sinais não motores que podem ser estomatognáticos e respiratórios, levando a disfunções importantes que podem levar ao óbito dos acometidos(38–40).

O tratamento da DP envolve medicação, sendo a levodopa (L-DOPA) o tratamento farmacológico mais utilizado. A levodopa é um fármaco precursor da dopamina e pode ser usada como monoterapia ou em conjunto com outros medicamentos(41,42). Outra forma medicamentosa de tratamento é por meio dos agonistas dopaminérgicos dos receptores D₁ e D₂, porém esse recurso terapêutico apresenta vários efeitos adversos aos pacientes(43). Os inibidores da degradação da dopamina como os inibidores da monoamina oxidase e os inibidores da Catecol-O-metiltransferase que são enzimas, também causam efeitos desfavoráveis aos pacientes(44).

Devido a todas as indesejáveis consequências que os atuais tratamentos farmacológicos proporcionam aos pacientes, e a falta de capacidade dos medicamentos existentes em diminuir o processo de progressão da doença, há a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos capazes de impedir a progressão da enfermidade.

1.3 MODELO ANIMAIS E BIOQUÍMICOS NO ESTUDO DA DP

Modelos animais são fundamentais para os avanços das ciências médicas, pois nos permitem o estudo dos mecanismos patogênicos e dos princípios terapêuticos do tratamento e dos sinais das doenças humanas mimetizadas. Assim,

estes mecanismos de estudo refletem as características da enfermidade na espécie humana, simulam as mudanças patológicas, histológicas e bioquímicas da patologia e seus distúrbios funcionais. Entretanto, a DP não se manifesta espontaneamente em animais, sendo necessária a indução de alguns sinais através da administração de agentes neurotóxicos. Infelizmente ainda não existe um modelo que pode, por si só representar fidedignamente todas as características da DP(45–47).

O modelo animal induzido pela toxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) foi o primeiro modelo animal associado com a morte de neurônios dopaminérgicos na DP(48). A perda maior de neurônios dopaminérgicos é observada na região ventral do encéfalo na SNpc, enquanto os neurônios da região mesocortical são os mais resistentes(48,49). As primeiras observações dos efeitos biológicos da 6-OHDA mostraram que este agente foi capaz de induzir uma depleção longa e duradoura de NA em nervos simpáticos no coração. Alguns anos mais tarde foram demonstrados que a injeção de 6-OHDA na SNpc era capaz de causar degeneração anterógrada dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais, gerando assim o primeiro modelo animal de DP. Desde esta descoberta, a 6-OHDA tem sido amplamente utilizada para mimetizar a neurodegeneração observada na DP(46).

A 6-OHDA, é estruturalmente semelhante à DA e NA (noradrenalina) e possui uma elevada afinidade para os transportadores de membrana destas catecolaminas(50). A 6-OHDA não atravessa a barreira hematoencefálica, portanto deve ser administrada diretamente no encéfalo. É transportada para os neurônios catecolaminérgicos através de mecanismos de transporte específico (p. ex., o DAT e o transportador de noradrenalina), uma vez dentro dos neurônios, é facilmente oxidada e induz a produção de radicais livres como ONOO e OH(51–54). Após a administração da 6-OHDA na SNpc, os neurônios dopaminérgicos começam a se degenerar em torno de 24 horas, e quando injetada no corpo estriado, a 6-OHDA causa uma degeneração gradativa e retrógrada de neurônios nigroestriatais, sendo possível testar intervenções terapêuticas, na medida em que a morte neuronal e ativação microglial ocorrem(50).

1.4 NEUROVESPINA E SEU POTENCIAL FARMACOLÓGICO

A Neurovespina é um peptídeo sintético modificado a partir da Occidentalina - 1202, uma neurotoxina de nove resíduos de aminoácidos isolada da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis* (figura 2). Além disso, semelhante à maioria das vespas sociais, essa espécie utiliza sua peçonha tanto para a defesa quanto para a proteção do ninho, e suas principais fontes de alimento consistem em uma variedade de insetos em estágios larvais. No geral, as presas quando capturadas, são transportadas até o ninho, onde são utilizadas para alimentar as crias, ou armazenadas para uso posterior(55).

Em um importante estudo, Mortari et al.(56) (2005), destacou que a partir da desnaturação da peçonha, e quando administrada por via intracerebroventricular (i.c.v) em ratos, ela demonstrou capacidade de proteger os animais contra crises epiléticas induzidas por convulsivantes químicos, além de aumentar a latência dos animais que tiveram a manifestação induzida(55). Nesse sentido, e como resultado de modificações estruturais posteriores, foi desenvolvida a Neurovespina, que se mostrou seis vezes mais potente que a Occidentalina-1202, com um efeito antiepilético dose-dependente, além de se mostrar capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. Em um estudo para avaliar o número de neurônios hiper-reativos após a indução de crise epilética, observou-se um efeito inibitório do tratamento com a Neurovespina, o que indica também um efeito neuroprotetor indireto, pois foi capaz de impedir a hiperexcitação e a morte de neurônios em decorrência da excitotoxicidade glutamatérgica(20).

Ademais, outro trabalho testou pela primeira vez o efeito antiparkinsoniano e neuroprotetor do peptídeo, verificando que a Neurovespina foi capaz de reduzir a descoordenação motora e perda de neurônios imunorreativos para a enzima Tirosina Hidroxilase (TH) em camundongos, demonstrando ser uma importante ferramenta potencial para o entendimento de doenças neurodegenerativas como a DP e como fármaco modelo para o desenvolvimento de novas moléculas neuroativas (57).

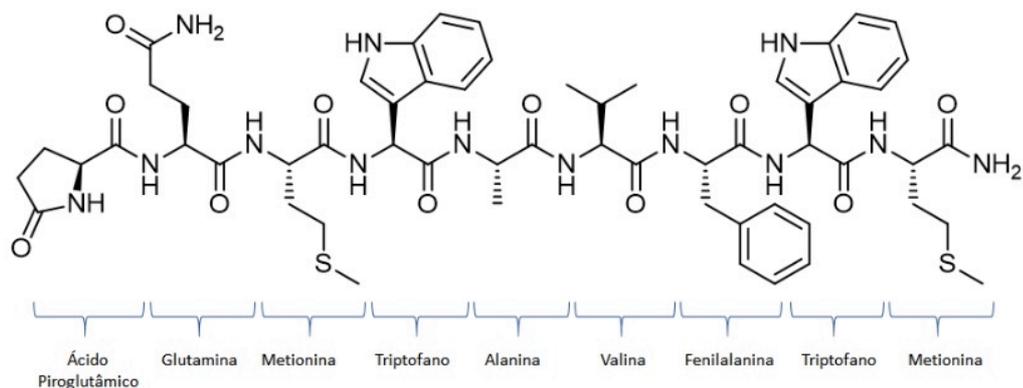


Figura 2 - Fórmula estrutural do peptídeo Neurovespina. Massa molecular de 1208,53 Da e nove resíduos de aminoácidos: PyrE-Q-M-W-A-V-F-W-M-NH₂. Retirado de Campos(58), (2016).

1.5 NANOTECNOLOGIA NA ENTREGA DE FÁRMACOS

A nanotecnologia é aplicada em diversas áreas da ciência com o intuito de trazer a nanoescala para produtos já existentes nas escalas micro e macro. A comunidade científica e industrial tem grande interesse na utilização da nanotecnologia nos setores de cosmetologia(58), alimentício(59), agrícola(60), farmacêutico(61), biomedicina(62) entre outros. Assim, o uso da nanotecnologia tem diversas vertentes, incluindo a alteração dos meios de administração, aumento da eficiência, proteção contra degradação, aumento da solubilidade, formulações inéditas, entre outras tantas possibilidades farmacológicas(62). Dessa forma, tais potenciais de aplicação podem ser alcançados através da utilização de diferentes técnicas e ramos da nanotecnologia, como nanoemulsões, nanopartículas, nanofilmes, nanocompósitos, nanofibras, entre outros(63). Assim, os nanossistemas apresentam ser um caminho alternativo que possibilitam alterações significativas nas características físico-químicas de fármacos, gerando distintas possibilidades de aplicação e administração.

Alguns estudos já descreveram o uso de diversos nanossistemas para a entrega de fármacos ao sistema nervoso central, onde se destacam a L-DOPA (precursor da dopamina)(64,65); doxorubicina(66); rotigotina(67), dopamina(68–70).

Diversas variedades de nanocarreadores já demonstraram capacidade de melhorar o perfil de liberação de um fármaco, permitindo seu transporte para o local

específico, a fim de garantir sua atividade terapêutica com segurança máxima. Entre esses nanocarreadores, são comumente utilizados os lipossomas; as nanopartículas lipídicas sólidas; os dendrímeros; nanopartículas poliméricas; entre outros(71) (figura 3).

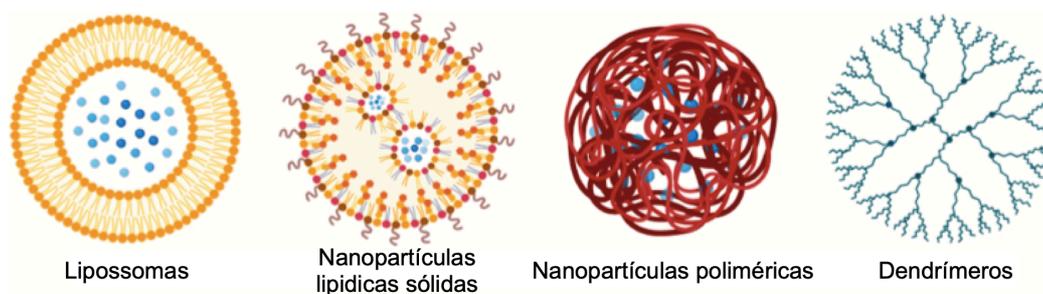


Figura 3 - Ilustração representativa de alguns exemplos de sistemas de entrega de fármacos baseados em nanotecnologia. Retirado de Lima LS & Mortari MR(72), 2021 (com adaptações).

Como exemplo, as nanopartículas poliméricas podem ser definidas como substâncias sólidas com dimensões que variam entre 10 e 1000 nm, possuindo uma notável capacidade de dissolver, encapsular, absorver ou incorporar tanto fármacos hidrofílicos quanto lipofílicos. Além disso, essas nanopartículas têm a capacidade de modular tanto o tempo de liberação quanto a quantidade do fármaco disponível no local de ação, otimizando assim o transporte através das membranas biológicas(72).

Neste trabalho, as nanopartículas poliméricas foram desenvolvidas a partir da quitosana, um biopolímero obtido a partir da quitina um dos polímeros mais abundantes na natureza. Podemos encontrá-la nas microfibrilas cristalinas que formam os componentes estruturais do exoesqueleto dos artrópodes, como insetos e crustáceos, em alguns moluscos ou nas paredes estruturais dos fungos e das leveduras. Adicionalmente, pode-se mencionar que a quitosana possui propriedades farmacêuticas como biocompatibilidade, biodegradabilidade, e não toxicidade; que fazem deste polímero um material com bom potencial para preparação de biomateriais(73,74).

Em suma, evidencia-se que os sistemas nanotecnológicos tem grande potencial de favorecer o uso de peptídeos como fármacos, devido a diversos desafios enfrentados por esse grupo de moléculas. Em sua forma livre, os peptídeos frequentemente apresentam baixa disponibilidade, incluindo a presença de

mecanismos protetores, como a barreira hematoencefálica, além da degradação dos peptídeos por proteases endógenas e as desvantajosas propriedades físico-químicas dos próprios fármacos(75–77).

Assim, conclui-se que as nanotecnologias representam uma ferramenta poderosa para otimizar o uso de peptídeos como fármacos, superando os desafios associados à sua administração na forma livre, abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e direcionadas. Portanto, o presente trabalho visa aprimorar a distribuição e aumentar a biodisponibilidade da Neuroespina no tecido cerebral, explorando uma estratégia de nanoencapsulamento e via de administração.

2 OBJETIVO GERAL

Comparar o perfil neuroprotetor e antiparkinsoniano do peptídeo Neurovespina na forma livre e associada a um sistema de liberação de fármacos em nanopartículas em um modelo murino da DP.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação do efeito da Neurovespina e do nanossistema na performance motora no RotaRod nos camundongos após lesão intraestriatal unilateral por 6-OHDA;
- Avaliação do efeito da Neurovespina e do nanossistema no teste de assimetria nos camundongos após lesão intraestriatal unilateral por 6-OHDA;
- Avaliação do efeito neuroprotetor da Neurovespina e do nanossistema pela quantificação de neurônios dopaminérgicos com imuno-marcação por anti-tirosina hidroxilase (anti-TH);
- Avaliação do efeito antiparkinsoniano e neuroprotetor da Neurovespina e do nanossistema, sob a via de administração subcutânea;

3 MÉTODO

3.1 BIOENSAIOS

Foram investigados 30 camundongos (*Mus musculus*) Swiss fêmeas com massa corporal entre 17 e 25 g, com 6 a 8 semanas de vida, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Os camundongos foram mantidos em temperatura em torno 25°C e umidade de 55% controladas em ciclo claro/ escuro de 12h. Os animais foram armazenados em grupo de cinco, ou dez (dependendo do tamanho da caixa) e o alimento *ad libitum* durante todo o período experimental.

Todos os procedimentos com os animais foram desenvolvidos seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), a Lei Arouca (Lei 11.794/2008), e realizados mediante aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UnB), de protocolo nº 032/2020 (Anexo 1).

3.2 NEUROCIRURGIA

Para indução de hemiparkinsonismo nos camundongos foi realizada uma cirurgia estereotáxica (figura 4) visando a infusão unilateral do composto neurotóxico 6-OHDA (Sigma-Aldrich®) no estriado dos animais, conforme protocolo adaptado de da Conceição et al.(78) (2010). Os animais foram anestesiados com cetamina (Dopalen, Ceva®, 75 mg/kg i.p.) e Xilazina (Anasedan, Ceva®, 15 mg/kg i.p) e fixados a um estereotáxico (*Insight Equipamentos*®). Em seguida, foi realizada assepsia com iodopovidona na região superior da cabeça dos sujeitos e administrada uma injeção local de cloridrato de lidocaína com hemitartarato de norepinefrina (Lidostesim® 3%, *Destsply Pharmaceutical*®, via s.c.) seguida de exposição do crânio dos animais para realização das medições estereotáxicas. O ponto de perfuração da área do estriado seguiu as seguintes coordenadas estereotáxicas em

relação à linha do bregma: +1,0 mm (anteroposterior), -1,8 mm (medio-lateral) e -3,5 mm (dorso-ventral), com base no atlas de Franklin e Paxinos (2019). Após a aferição das coordenadas citadas, foi realizado um orifício para a inserção de uma agulha de 0,3 mm de diâmetro ligada a uma seringa *Hamilton* e acoplada a uma bomba de infusão, sendo feita assim a administração da 6-OHDA (4 μ l, 10 μ g base livre/ μ l em solução salina 0,9% e ácido ascórbico 0,2%) a uma taxa de 0,5 μ l por minuto. Após o termino da infusão, a agulha foi mantida no local por quatro minutos adicionais com o objetivo de permitir a difusão do composto sem extravasamentos.



Figura 4 - Cirurgia estereotáxica em um sujeito do experimento. O círculo na imagem apresenta o alinhamento da agulha em relação ao bregma para a realização das medidas estereotáxicas.

3.3 CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS

Com intuito de reduzir a morbidez e a mortalidade dos indivíduos em decorrência do déficit motor causado pela cirurgia, foi seguido um protocolo de cuidados pós-operatórios adaptado de Smith & Heuer(79) (2011). Nos três primeiros

dias após a cirurgia, os animais receberam injeção de 200 µl de soro fisiológico com 5% de glicose por via i.p. para evitar a desidratação dos animais. Também foi oferecido um suplemento alimentar de aminoácidos e vitaminas, contendo: colágeno hidrolisado, pantotenato de cálcio, cloreto de colina, vitamina B6, frutose, dextrose, L-triptofano, L-carnitina, L-lisina, vitamina B1, vitamina B12, levedura inativada, DL-metionina, cisteína, betaína, vitamina C, ácido nicotínico, taurina, L-glutamina, extrato de alcachofra, inositol, maltodextrina, benzoato de sódio, metilparabeno, goma xantana, aroma de baunilha e água (Glicopan Gold®). Além disso, a ração foi macerada em água e disponibilizada aos animais em pequenos frascos dentro das caixas, facilitando a alimentação e evitando-se, assim, a desnutrição dos animais e perda excessiva de peso. Ao término do procedimento, os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UnB sob as condições anteriormente relatadas.

3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para a avaliação da atividade antiparkinsoniana do peptídeo e do nanossistema, foi estabelecido um protocolo de 8 dias desde a lesão com 6-OHDA até o último dia de experimento, no qual os animais foram eutanasiados. Durante todo o período do protocolo experimental, foram realizados os tratamentos dos animais com o peptídeo Neurovespina; com os nanossistemas; ou os devidos controles. A avaliação do comprometimento motor no equipamento RotaRod, e avaliação no teste de assimetria foram realizados no 3º, 5º e 7º dia de experimento. O dia da cirurgia foi intitulado D0, o dia 24h após a cirurgia foi intitulado D1 e assim sucessivamente, conforme desenho experimental (figura 5).

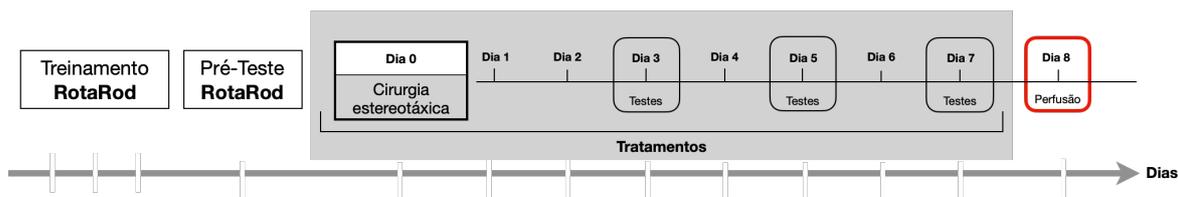


Figura 5 - Desenho experimental evidenciando as etapas do trabalho e o regime de tratamento utilizado.

Foram utilizados quatro grupos experimentais (tabela 1), sendo que três deles tiveram a lesão induzida por 6-OHDA e receberam como tratamento: (a) o peptídeo Neurovespina livre na dose de 4 mg/kg (duas vezes por dia); (b) o peptídeo encapsulado no nanossistema (20 µg/animal); e (c) a solução veículo (salina 0,9%), sendo o grupo controle lesão. O último grupo foi submetido à cirurgia, porém, ao invés de 6-OHDA, recebeu infusão estriatal somente da solução veículo (salina 0,9%) e tratamento com a mesma solução via s.c., representando um controle do modelo experimental (*sham*). Todas as administrações foram por via s.c., e em um volume total de 150 µl por animal. Todos os tratamentos começaram no dia 0 (D0) após uma hora de término da cirurgia.

Tabela 1 – Número de sujeitos utilizados e compostos administrados por via intraestriatal ou por via subcutânea (tratamento) de acordo com cada grupo experimental.

Grupo Experimental	nº Sujeitos	Infusão estriatal	Tratamento (s.c.)
Controle lesão	7	6-OHDA	NaCl 0,9%
Neurovespina	7	6-OHDA	Neurovespina livre (4mg/kg)
NANONeuro	8	6-OHDA	Nano+Neurovespina (20µg/animal)
<i>Sham</i>	8	NaCl 0,9%	NaCl 0,9%

3.5 PREPARO DO PEPTÍDEO E NANOSSISTEMA

O peptídeo Neurovespina foi sintetizado pela empresa Biotech Biotecnologia Ltda, com pureza atestada pelo Laboratório de Neurofarmacologia da Universidade de Brasília. O desenvolvimento dos nanossistemas, caracterização e estabilidade (nanoemulsão + Neurovespina) foram realizados pelo Laboratório de Nanobiotecnologia da UnB e a análise morfológica no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LMCE) da UnB.

3.6 COMPROMETIMENTO MOTOR

Para a avaliação de alterações comportamentais motoras após a lesão por 6-OHDA, foram utilizados dois testes: o teste de performance motora (RotaRod) e o teste de assimetria (teste do cilindro).

3.6.1 Teste de performance motora

No teste de performance motora foi utilizado o equipamento denominado RotaRod (*Insight Equipamentos*®, Brasil). Este equipamento consiste em um cilindro de 60mm de diâmetro, com rotação a uma velocidade crescente de 4 a 41rpm, no qual o animal deve se manter caminhando para permanecer no topo do cilindro, permitindo assim quantificar déficits na atividade motora em termos da latência de queda (tempo desde o posicionamento do animal no equipamento até sua eventual queda) após a lesão por 6-OHDA. Espera-se que animais sadios permaneçam mais tempo caminhando no aparelho que animais com descoordenação motora induzida pela infusão de 6-OHDA. Os animais foram treinados no aparelho RotaRod durante 3 dias consecutivos, onde realizaram três ciclos de cinco minutos de caminhada, com um intervalo de quinze minutos entre cada ciclo para descanso dos animais. Finalizado o treinamento (e um dia antes da cirurgia, ou dia -1) os animais foram selecionados por meio de um pré-teste, na qual realizaram novamente os três ciclos

de cinco minutos de caminhada, onde ao final foi calculada a média aritmética dos tempos. Somente os animais capazes de permanecer por pelo menos 150 segundos na barra giratória foram submetidos à cirurgia.

A latência de queda (usada como medida de descoordenação motora) consiste da média de três registros diários no RotaRod em intervalos de quinze minutos entre cada medição, sendo realizadas nos dias D3, D5 e D7 do estudo. É considerada como latência máxima a permanência de cinco minutos (300 segundos). Para animais que permaneceram por mais que esse tempo, a latência é considerada como máxima e estes são retirados do aparelho.

3.6.2 Teste de assimetria

No teste de assimetria (teste do cilindro) foram avaliados deficits unilaterais no uso voluntário dos membros anteriores. Neste ensaio, foi utilizado um Becker de vidro de 2 L, com diâmetro de 131 mm de base e 181 mm de altura. O teste consistiu em calcular o número de contatos dos membros anteriores dos animais com a parede do cilindro, usando o membro ipsilateral (membro localizado no mesmo lado do hemisfério cerebral onde estava a lesão), o contralateral (membro oposto ao lado lesionado), e ambos os membros (simultaneamente), durante 10 minutos. Entretanto, o sujeito precisava se apoiar apenas nos membros posteriores para que o contato fosse contabilizado. Os animais foram filmados por meio de uma câmera acoplada a um computador, e as imagens foram posteriormente analisadas e as contagens realizadas. Para a realização deste teste os animais não foram habituados, o que permite maior exploração e torna o teste mais fidedigno.

O teste foi realizado nos dias D3, D5 e D7 do experimento (e após 10 min de descanso), logo depois que terminavam o teste no RotaRod. Assim, foi avaliado um escore de assimetria, somando o número de contatos realizados com o membro ipsilateral, mais a metade do número de contatos com os dois membros, dividido pelo somatório do número de toques com o membro ipsilateral, mais o membro contralateral, e com os dois membros, multiplicado por 100 (Figura 6). Desta forma, foi estabelecido um percentual de assimetria geral, onde um resultado de 50% indica que o animal explora simetricamente o ambiente com ambos os membros. As

pontuações mais altas (>50%) demonstram que o sujeito usa mais o membro ipsilateral (do lado sadio), e as pontuações mais baixas (<50%) refletem uma maior utilização do membro localizado no lado lesionado(80,81). Por ser simples e eficiente, o teste do cilindro é amplamente utilizado em modelos unilaterais da DP, uma vez que lesões em um hemisfério cerebral induzem um menor uso do membro contralateral (82,83).

$$C \text{ de assimetria} = \frac{\text{n}^\circ \text{ contatos membro ipsilateral} + \frac{1}{2} \text{ contato ambos os membros}}{\text{n}^\circ \text{ contatos membro ipsilateral} + \text{contralateral} + \text{ambos os membros}} \times 100$$

Figura 6 - Equação utilizada para calcular o percentual de assimetria geral dos sujeitos no teste do cilindro. Retirado de Woodle et al (81).

Além disso, com o teste do cilindro também foi calculado o percentual de toque de ambos os membros, registrando o numero de toques que o sujeito fez com a parede do cilindro utilizando os dois membros simultaneamente, dividido pela soma do número de contatos com a parede do cilindro com o membro ipsilateral, mais o contralateral, mais os dois membros anteriores. Os camundongos saudáveis devem ter um desempenho de em média 50% neste ensaio (81-85)(figura 7).

$$\% \text{ uso ambos os membros} = \frac{\text{n}^\circ \text{ contatos com ambos os membros simultaneamente}}{\text{n}^\circ \text{ contatos membro ipsilateral} + \text{contralateral} + \text{ambos os membros}} \times 100$$

Figura 7 - Equação utilizada para calcular o percentual de uso de ambos os membros. Retirado de Sharllet T, Tillerson JL (85).

3.7 EUTANÁSIA E SECÇÃO CEREBRAL

Finalizados os testes comportamentais, os sujeitos foram eutanasiados com tiopental sódico (*Thiopentax, Cristália®*; 60mg/kg de animal) e perfundidos por via

transcardíaca com 0,9% de NaCl e em seguida com formaldeído 4%. Logo após, os encéfalos dos animais foram removidos com auxílio de pinça, tesoura, e alicate e colocados em solução de formaldeído 4% até a total fixação do tecido. Após o período de fixação, os encéfalos foram colocados em solução de sacarose 30% por 48h e em seguida foram feitos cortes coronais de 30 μ m de espessura em criostato semiautomático (*Histo-Line Laboratories*® MC-4000). Foram selecionados cortes região do estriado (0,26 a 0,50 mm em relação ao Bregma) e da substância negra (-3,64 a -3,16 mm em relação ao Bregma). Cortes adicionais do local da inserção da agulha para infusão de 6-OHDA também foram coletados para verificar o correto posicionamento da mesma durante a cirurgia. Os cortes foram estocados em solução anticongelamento (30% glicerina e 30% etilenoglicol) a 4°C até o momento da marcação das células.

3.8 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

A análise dos neurônios do estriado e da substancia negra foi realizada por meio da imuno-marcação de anti-tirosina hidroxilase (anti-TH), uma enzima importante para a síntese de catecolaminas, presente dos neurônios dopaminérgicos. De cada sujeito foram separados três cortes, tanto do estriado quanto da SN. Inicialmente, os tecidos foram retirados da solução de anticongelamento e lavados três vezes com tampão fosfato-salina (*Phosphate Buffered Saline* – PBS; NaCl 137mM, KCl 2,7mM, NaHPO₄2H₂O 10mM), por cinco minutos. Em seguida, os cortes foram incubados em solução de peróxido de hidrogênio 3% (H₂O₂) por trinta minutos. Após duas lavagens de trinta minutos com solução de PBS contendo 0,8% de Triton X-100 ([C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_n]-*Sigma-Aldrich*®) para permeabilização das células, ocorreu a incubação com *Protein Block* (1% BSA, 10% leite desnatado, 0,3M de glicina e 0,3% Triton X-100) por mais trinta minutos, para bloqueio de proteínas inespecíficas. Após esse período, os tecidos foram incubados com o anticorpo primário de coelho (ab112; abcam®) (1:1000) por 48 horas a 4°C em agitação constante. Ao fim desse período, os cortes foram lavados com PBS por duas vezes durante 15 minutos cada, e incubados com o anticorpo secundário anti-coelho (ab150077; abcam®) (1:400) à temperatura ambiente, por

duas horas e em agitação constante. Em seguida, os cortes foram lavados novamente (por duas vezes) com PBS, durante quinze minutos, e incubados à temperatura ambiente com o complexo peroxidase (PAP), em agitação constante, por uma hora e trinta minutos. Ao término dessa etapa, os cortes foram lavados com PBS por duas vezes de quinze minutos, e então foram incubados com DAB 0,06% (3,3' diaminobenzidina, 99% [(NH₂)₂C₆H₃C₆H₃(NH₂)₂]-*Sigma-Aldrich*®) em agitação constante, e temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, todo o DAB foi retirado e foi adicionado uma solução de DAB + H₂O₂ (3%). Por fim, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS e fixados em lâminas de microscopia para posterior análise.

A observação das lâminas foi realizada através de microscópio óptico (Leica® DM2000). Na análise da VTA e Sustância Negra, os neurônios marcados com anti-TH (THr) foram contados manualmente com o auxílio do programa *ImageJ* (*National Institute of Health-NIH*) a partir de fotos coletadas com aumento de 200x. O hemisfério cerebral oposto a cirurgia (contralateral ou sadio), foi utilizado somente como controle interno para lado lesionado (ipsilateral), resultando em uma porcentagem de neurônios THr remanescentes, utilizando-se a seguinte fórmula: (quantidade de neurônios do lado ipsilateral/ quantidade de neurônios do lado contralateral) x 100. Além disso, a contagem dos neurônios foi realizada somente nas células neuronais com citoplasma bem definido, integro e com boa coloração, além de possuir contorno da região nuclear bem visível, conforme figura 8.

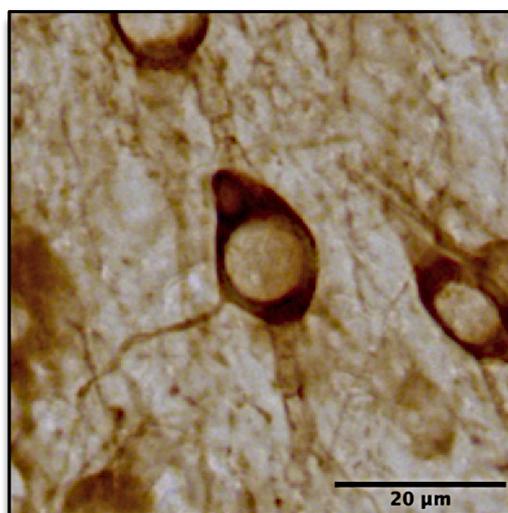


Figura 8 - Exemplo de neurônios THr, em aumento de 400x, definido com viável para contagem de células. Barra de escala em 20μm.

Para a análise do estriado, foram capturadas imagens dessa região em aumento de 40x e selecionadas regiões de interesse (RI), sendo em seguida medido o valor médio de cinza (VC) utilizando o mesmo programa computacional já citado utilizando o cálculo de Densidade Ótica (DO) seguindo a fórmula de Palha et al(86) (2002).

3.9 ANÁLISE DE DADOS

Para análise dos dados foi utilizado o Software *GraphPad Prism 9* (San Diego, CA), e os valores estatisticamente significantes foi considerado $p < 0,05$.

Para comparações envolvendo mais de dois grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste de Tukey, para distribuições normais de variância semelhante, considerando-se significativos os valores de $p < 0,05$. Os resultados com distribuição normal e com duas variáveis foram submetidos ao teste de análise de variância para múltiplas repetições (*two-way* ANOVA), sendo utilizado o Bonferroni como post-hoc. A “*two-way*” ANOVA também foi utilizada para comparar a quantidade de neurônios THr da SNPc e da VTA entre o lado ipsilateral e o lado contralateral dentro de cada grupo, bem como na análise de Densidade Ótica do estriado. Já a porcentagem de neurônios THr remanescentes e a porcentagem de DO foram analisados por meio do teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Todos os gráficos foram expressos em termos da média e do erro padrão da média (EPM).

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DO COMPROMETIMENTO MOTOR

A avaliação do comprometimento motor foi realizada pela média de três ciclos de, no máximo, 300 segundos, em 3 dos 8 dias do protocolo experimental. Todos os animais utilizados foram selecionados de forma que somente aqueles capazes de permanecer no mínimo 150 segundos no RotaRod foram conduzidos à cirurgia (D0). 72 horas depois da cirurgia, todos os animais com lesão por 6-OHDA apresentaram significativa redução na latência de queda. Foi possível perceber também, que nos animais do grupo Controle lesão a latência de queda se manteve abaixo dos demais durante todo o experimento, enquanto nos animais tratados com a Neurovespina na forma livre apresentaram melhora estatisticamente significativa em seu desempenho no equipamento, indicando efeito positivo do tratamento (figura 9). Os animais tratados com a Neurovespina nanoencapsulada (NANONeuro) não apresentaram diferença estatística significativa no desempenho. A partir da avaliação pela ANOVA de duas vias para medidas repetidas foi possível observar diferença significativa tanto no efeito do dia [$F_{(3, 100)} = 11,00$; $p < 0,0001$] quanto por efeito do tratamento [$F_{(3, 100)} = 17,37$; $p < 0,0001$], entretanto, não foi observada diferença estatística significativa na interação entre os dois [$F_{(9, 100)} = 1,249$; $p < 0,2745$].

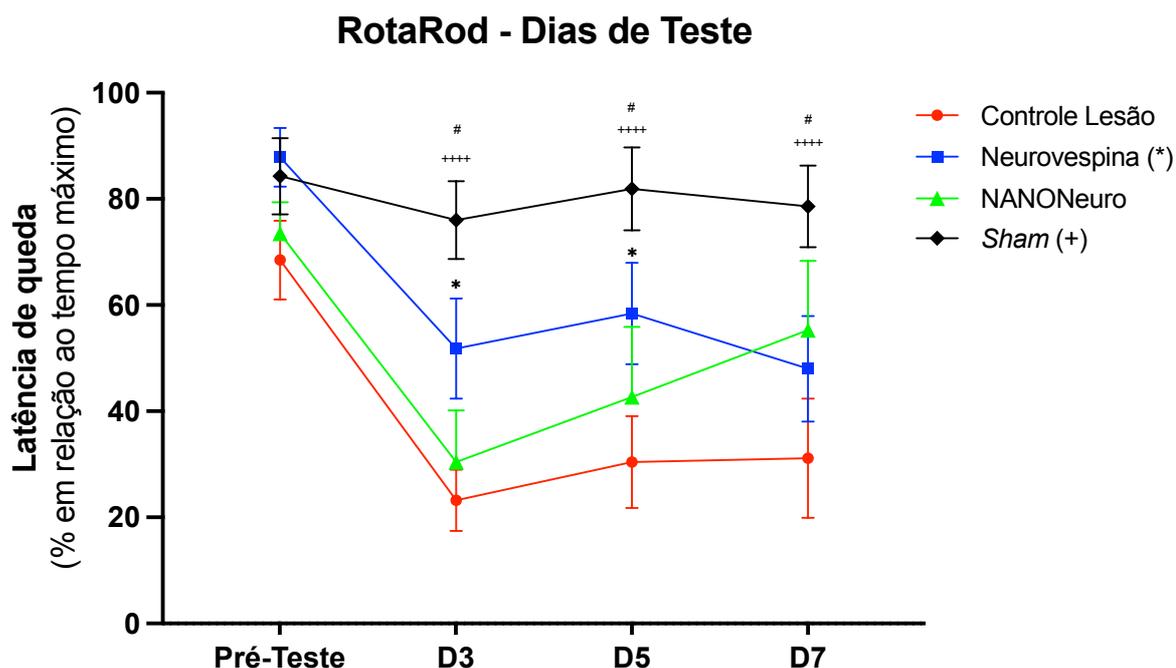


Figura 9 - Avaliação do comprometimento motor em termos da latência de queda (% em relação ao máximo) no pré-teste, e nos 3 dias do ensaio após a cirurgia (D0). Análise estatística feita por ANOVA de duas vias com pós-teste de Dunnett. Resultados expressos como média \pm EPM. Diferenças significativas em comparação com o Controle lesão. *Sham*: ++++= $p < 0,0001$; Neurovespina: *= $p < 0,001$. Diferença significativa em comparação com o grupo *Sham*. NANONEuro: # = $p < 0,05$.

A partir do primeiro ensaio comportamental no RotaRod (D3) até o final do experimento, observou-se diferenças significativas entre a latência do grupo *Sham* e do grupo controle Lesão com $p < 0,0001$. Quanto ao grupo tratado com a Neurovespina, nos dois dias seguintes de ensaio foi observada diferença significativa em comparação com o grupo controle lesão, com latência média apresentando valor de $p < 0,001$ em D3 e D5. Já no terceiro dia de experimento houve uma redução da latência de queda. Os sujeitos do grupo NANONEuro divergiram significativamente apenas com os do grupo *Sham* ao longo dos três dias de ensaio, e quando comparados separadamente, no D3 (NANONEuro) com D3, D5, D7 (do grupo *Sham*), obtiveram-se valores de $p = 0,0436$; $0,0102$; e $0,0235$, respectivamente.

A partir da análise do tempo médio de latência de queda, foi possível observar o desempenho motor dos animais ao longo de todo o experimento. A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa com média de $F_{(3, 25)} = 5,800$ e $p = 0,0038$, apenas entre o grupo *Sham* e o grupo Controle lesão (figura 10).

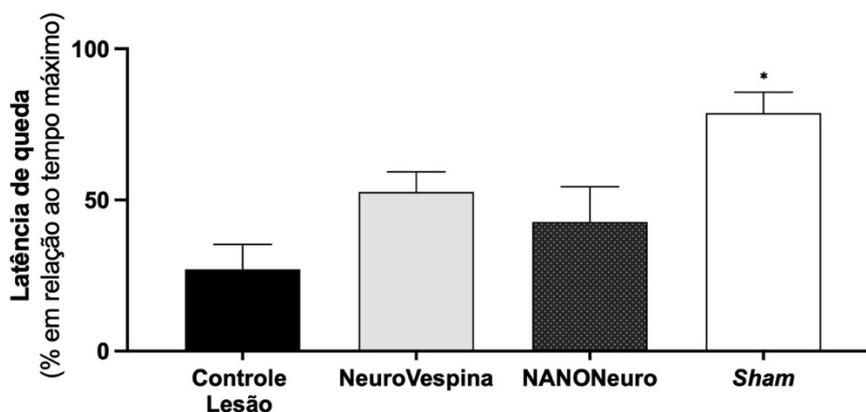


Figura 10 - Análise do tempo médio de latência de queda (% em relação ao tempo máximo) nos quatro grupos experimentais do trabalho. Análise estatística feita por “one-way” ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. Resultados expressos como média \pm EPM. Diferença estatística significativa em comparação com o controle lesão. * $p = 0,0012$.

4.2 AVALIAÇÃO DA ASSIMETRIA

Para avaliação da assimetria nos sujeitos foi utilizado o teste do cilindro em três tempos diferentes, nos dias 3, 5 e 7 do experimento. Quando analisados por meio da média dos diferentes dias de ensaio, o coeficiente de assimetria não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos (Figura11)

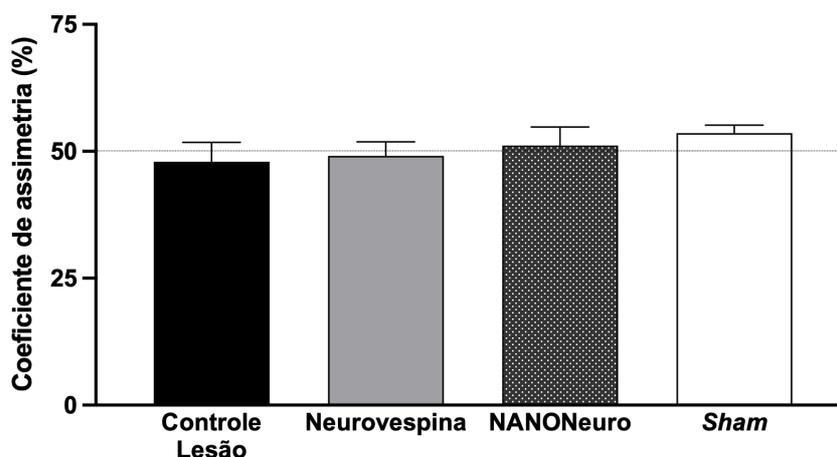


Figura 11 - Análise comparativa entre os coeficientes de assimetria nos quatro grupos experimentais do trabalho. Análise estatística feita pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Resultados expressos como média \pm EPM. Não foi encontrada diferença estatística significativa entre os grupos.

Além disso, foi calculado o percentual total de toque de ambos os membros simultaneamente na parede do cilindro do ensaio, onde todos os grupos de experimento apresentaram diferença estatística significativa quando comparadas com o grupo *Sham* com valor de $F_{(3, 21)} = 6,756$ e $p = 0,0023$ (figura 12). Contudo, não foi observada diferença estatística significativa nos grupos Neurovespina e NANONEuro quando comparados com o grupo Controle lesão.

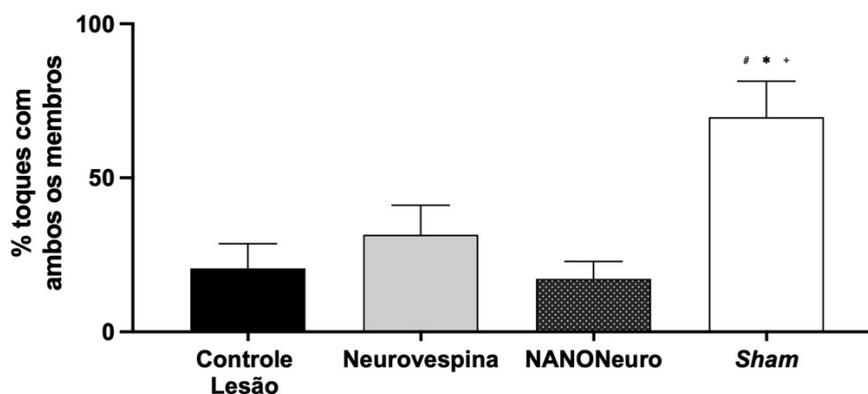


Figura 12 - Avaliação do percentual de toques na parede do cilindro utilizando ambos os membros simultaneamente. Análise estatística feita por “one-way” ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. Resultados expressos como média \pm EPM. Diferenças significativas em comparação com o grupo *Sham*. Controle lesão (+): $p = 0,0097$; Neurovespina (*): $p = 0,0313$; NANONEuro (#): $p = 0,0035$.

4.3 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE NEURÔNIOS

Os neurônios foram contados manualmente após imuno-histoquímica anti-TH e análise em microscopia. Primeiramente, foi avaliada a diferença do número total de neurônios da região da Área Tegmentar Ventral (VTA) com os da Substância Negra *pars compacta* (SNpc), entre o lado ipsilateral e o lado contralateral dentro de cada grupo experimental, e, em seguida, apenas células da SNpc.

Na contagem da VTA+SNpc, o grupo controle lesão e o grupo NANONEuro apresentaram diferença estatística significativa no número de células neuronais quando comparados os dois lados encefálicos. A partir da avaliação da ANOVA de duas vias foi possível observar diferença significativa tanto nos efeitos do tratamento [$F_{(3, 36)} = 5,518$; $p = 0,0032$] quanto no número de células dos lados encefálicos [$F_{(1,$

$_{36}) = 19,43; p < 0,0001]$, bem como na interação entre os dois [$F_{(3, 36)} = 5,269; p = 0,0041]$ (Figura 13).

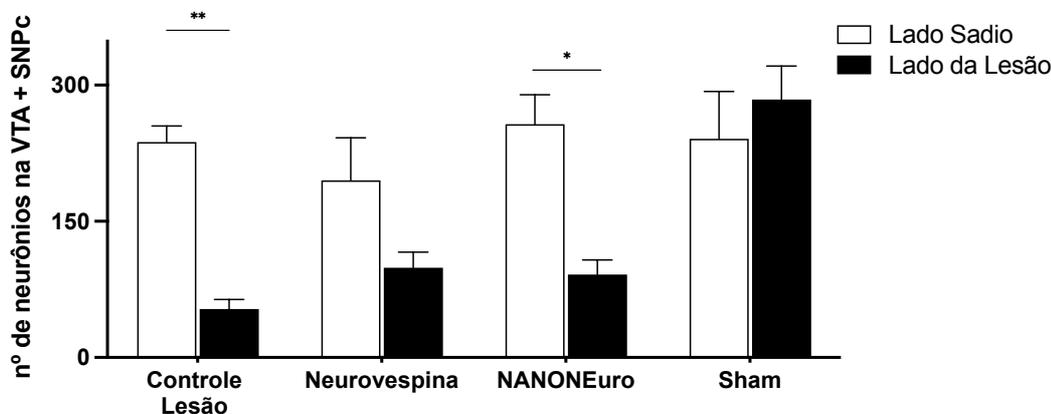


Figura 13 - Comparação entre a quantidade de neurônios THr na VTA+SNpc do lado ipsilateral (lesionado) e lado contralateral (sadio) do encéfalo, em cada grupo experimental. Análise estatística feita por ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. Resultados expressos como média \pm EPM. * $p = 0,0094$; ** $p = 0,0018$.

Em seguida, foi calculada a porcentagem de neurônios THr remanescentes da VTA+SNpc tomando-se por base o lado do hemisfério contralateral à lesão, sendo que as porcentagens médias de cada grupo foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn (figura 14). Diferença estatística significativa foi observada nos grupos controle lesão e NANONEuro, quando comparados com o grupo *sham*.

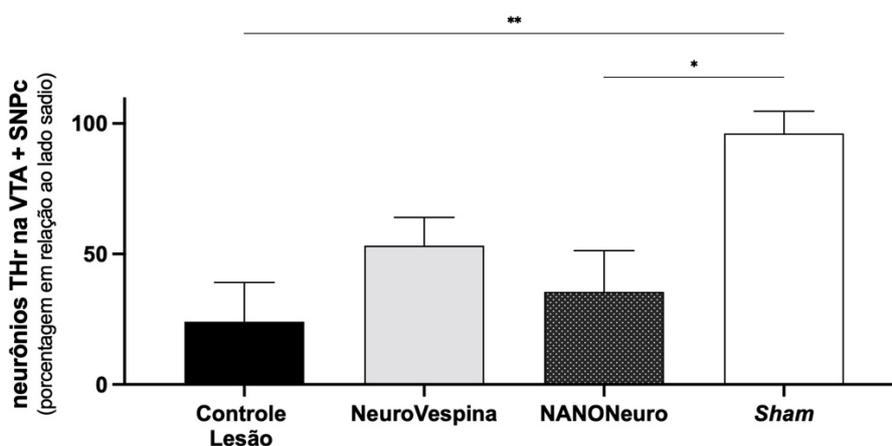


Figura 14 - Avaliação da porcentagem de neurônios THr remanescentes na VTA+SNpc em relação ao lado contralateral do hemisfério (sadio) dos grupos de tratamento avaliados. Análise estatística por

Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn. Resultados expressos como média \pm EPM. Diferença estatística significativa em comparação com o grupo sham. * $p=0,0193$; ** $p=0,0018$.

Quando avaliado o número de células neuronais THr apenas da região da SNpc, entre o lado ipsilateral e contralateral da lesão, novamente houve diferença estatística significativa entre os grupos controle lesão e NANONEuro. A partir da avaliação da ANOVA de duas vias foi possível observar diferença significativa tanto nos efeito do tratamento [$F_{(3, 36)} = 5,425$; $p=0,0035$] quanto no número de células dos lados encefálicos [$F_{(1, 36)} = 23,86$; $p<0,0001$], bem como na interação entre os dois [$F_{(3, 36)} = 4,120$; $p=0,0131$] (figura 15).

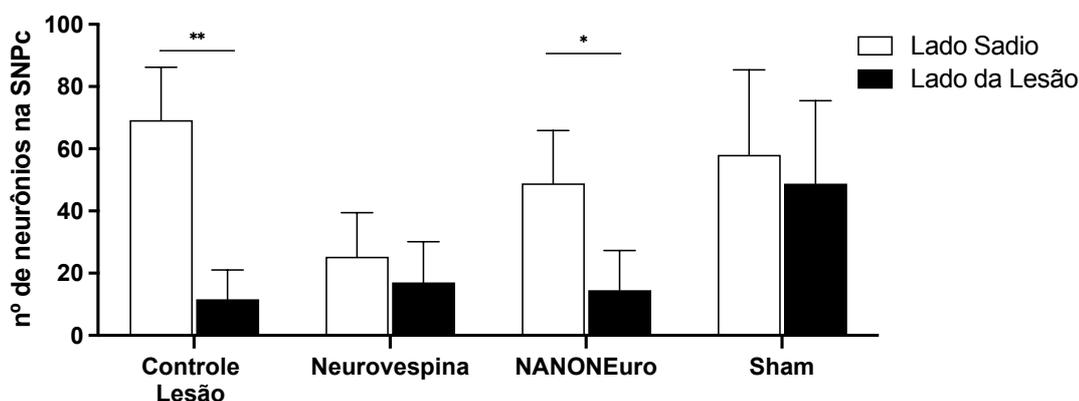


Figura 15 - Comparação entre a quantidade de neurônios THr na SNpc do lado ipsilateral (lesionado) e lado contralateral (sadio) do encéfalo, em cada grupo experimental. Análise estatística feita por ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. Resultados expressos como média \pm EPM. * $p=0,0001$; ** $p=0,0020$.

Além disso, foi calculada a porcentagem de neurônios THr remanescentes apenas da SNpc e tomando por base o lado do hemisfério contralateral à lesão. As porcentagens médias de cada grupo foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn (figura 16). Foi possível observar diferença estatística significativa nos grupos controle lesão e NANONEuro, quando comparados com o grupo *Sham*.

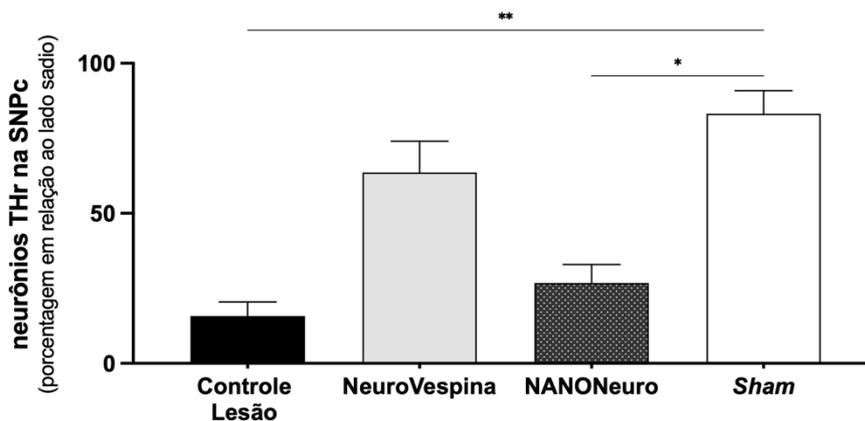


Figura 16 - Avaliação da porcentagem de neurônios THr remanescentes na SNpc, em relação ao lado contralateral do hemisfério (sadio), dos grupos de tratamento avaliados. Análise estatística por Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn. Resultados expressos como média \pm EPM. Diferença estatística significativa em comparação com o grupo *sham*. * $p=0,0257$; ** $p=0,0033$.

Um amostra das imagens obtidas para a contagem das células neuronais logo após a marcação imuno-histoquímica com a enzima anti-TH está mostrada na Figura 17. As fotomicrografias representativas da VTA e SNpc de cada grupo demonstram visivelmente uma perda neuronal nos grupos que receberam injeção intraestriatal de 6-OHDA, e considerável preservação de neurônios no grupo que teve administração de veículo, o grupo *Sham* (figura 17).

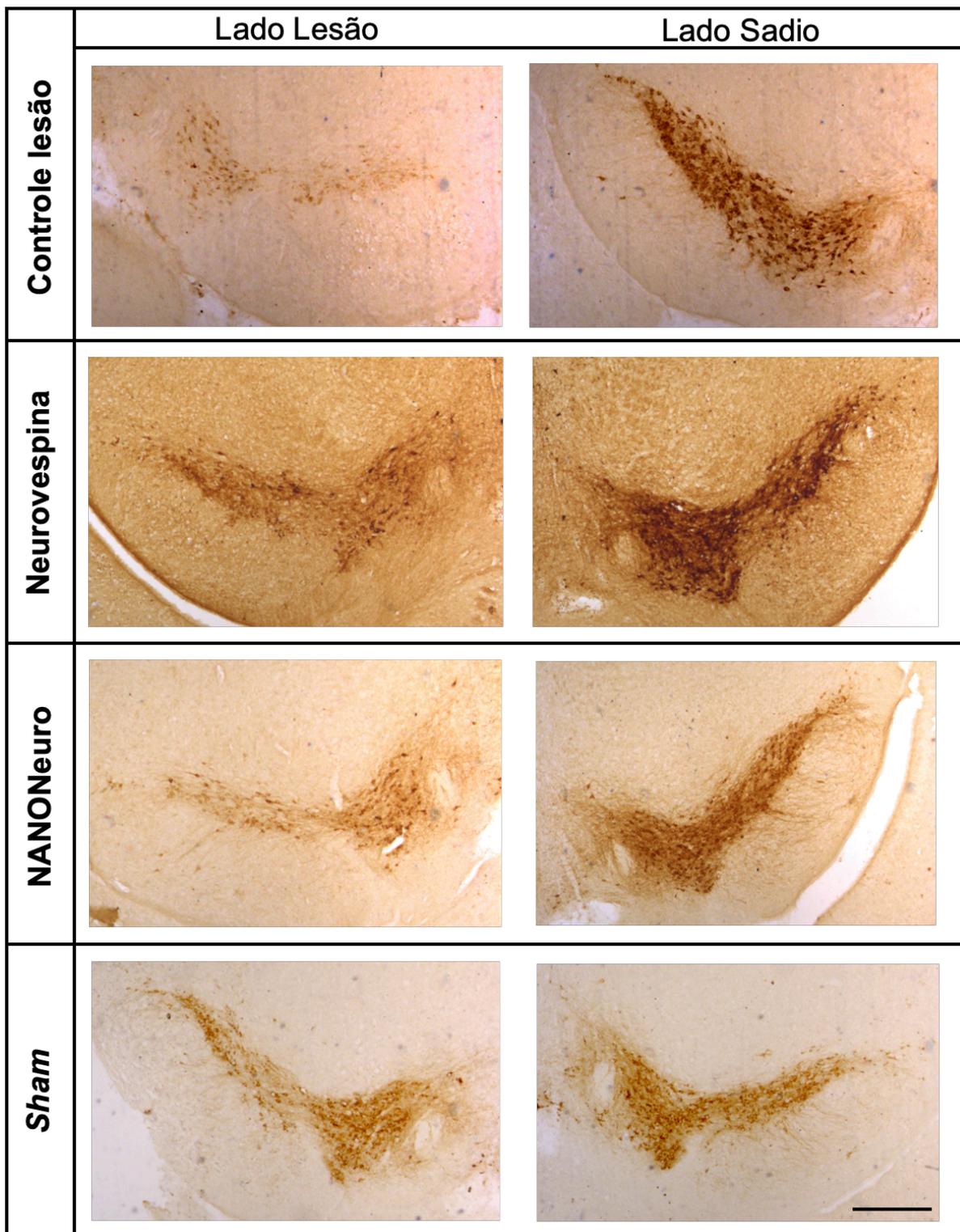


Figura 17 – Fotomicrografia das secções coronais representativas da região da Substância Negra e da VTA com imunomarcção de anti-tirosina hidroxilase (anti-TH) para cada um dos grupos experimentais. Na esquerda encontra-se o lado ipsilateral à lesão (lesionado), e o lado contralateral à lesão (sadio) à direita. Escala de 500 μ m. Distância relativa ao bregma -3.07mm.

4.4 DENSITOMETRIA DE TERMINAIS TH+ NO ESTRIADO

A partir da análise de densidade ótica do estriado foi possível investigar o grau de degeneração das fibras nervosas THr. A densidade ótica (DO) estriatal foi calculada a partir de valores de cinza obtidos com auxílio do programa *ImageJ*, sendo que foi comparada a diferença entre valor médio de DO do lado ipsilateral e do lado contralateral por meio do teste t-Student. À exceção do grupo *Sham*, todos os outros grupos demonstraram diferença significativa entre os lados com $p < 0,05$ (figura 18).

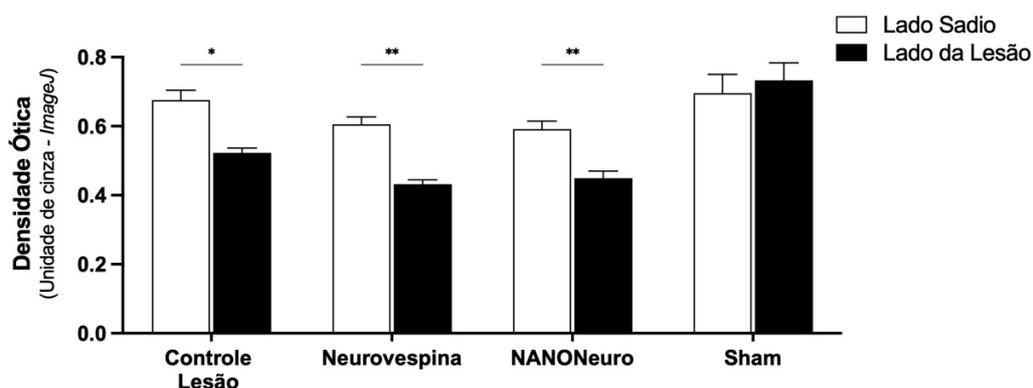


Figura 17 - Comparação da densidade ótica estriatal entre o lado ipsilateral (lesão) e a do lado contralateral (sadio) em cada grupo experimental. Resultados expressos como média \pm EPM. Análise estatística feita pela “two-way” ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Ao analisar a porcentagem média de DO, tendo como base o lado contralateral, foi obtida diferença significativa entre as médias utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis ($X^2 = 15,99$, $p < 0,05$). Na comparação entre cada média e o controle lesão, somente o grupo *Sham* exibiu média com $p < 0,05$. Nenhum dos grupos tratados exibiu diferença significativa (figura 19).

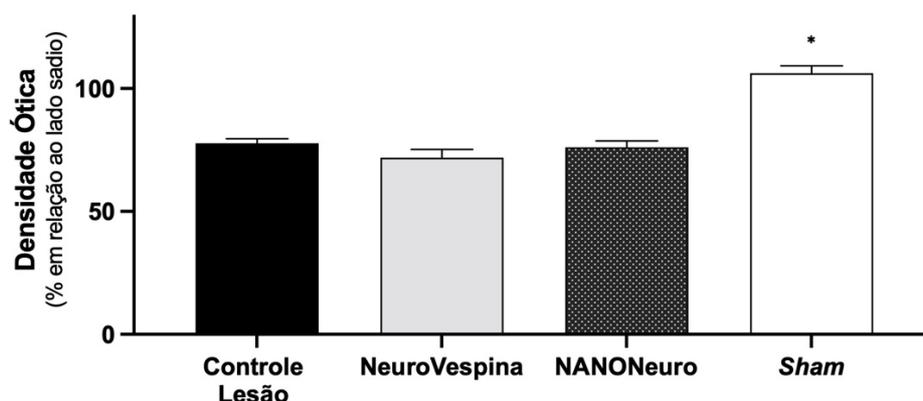


Figura 18 - Avaliação da porcentagem de densidade ótica estriatal em relação ao lado contralateral. Análise estatística por Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn. Resultados expressos como média \pm EPM. Diferença significativa em comparação com o grupo controle Lesão. *= $p < 0,05$.

Imagens das áreas analisadas estão mostradas na figura 20. O grupo *sham* não apresentou diferença entre os lados cerebrais, mas o grupo controle lesão demonstrou perda acentuada das projeções dopaminérgicas estriatais no hemisfério injetado com 6-OHDA, como demonstrado na figura 21.

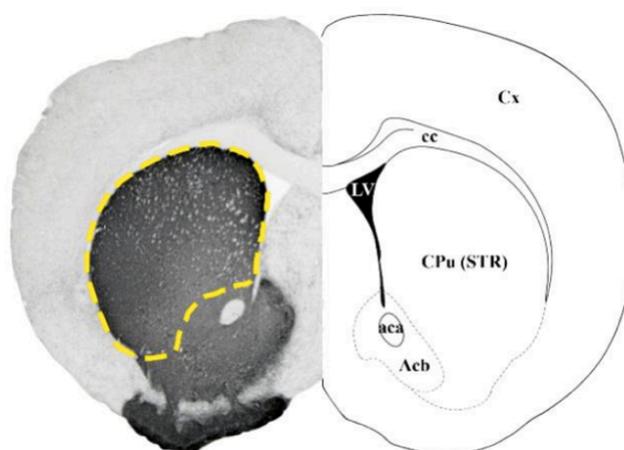


Figura 19 - Secção coronal ilustrativa evidenciando a área utilizada (pontilhado em amarelo) para quantificação de densidade ótica do estriado (à esquerda), e desenho baseado no atlas de estereotaxia com delimitações das principais estruturas que foram utilizadas como parâmetros para delimitações do STR (à direita). Acb = núcleo acumbens; aca = comissura anterior; cc = corpo caloso; CPu (STR) = caudato putâmen (estriado); Cx = córtex cerebral; LV = ventrículo lateral.

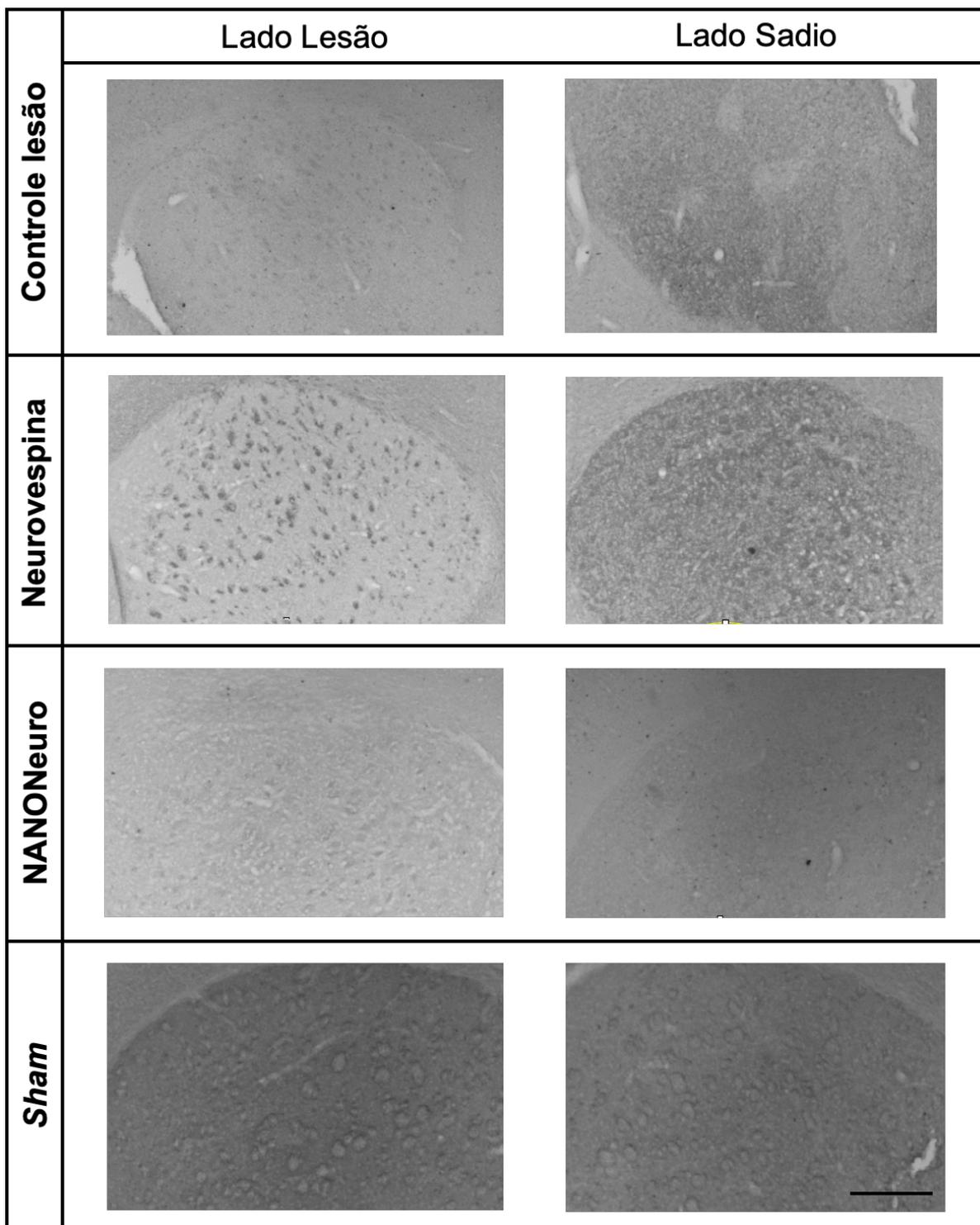


Figura 20 - Fotomicrografia das secções coronais representativas da fibras estriatais marcadas com anti-TH utilizadas para análise da densidade ótica em cada um dos grupos experimentais. Na esquerda encontra-se o lado ipsilateral à lesão (lesionado), e o lado contralateral à lesão (sadio) à direita. Escala de 500 μ m. Distância relativa ao bregma 0.61mm. Imagem transformada para escala de cinza através do software *ImageJ*.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, testamos pela primeira vez a hipótese de que o tratamento com o peptídeo sintético Neurovespina associado a um nanossistema (grupo NANONEuro) - além de o comparar com sua forma livre - poderia exercer funções neuroprotetoras e antiparkinsonianas em modelo murino da DP induzido por 6-OHDA. Para tal, investigamos os efeitos do tratamento do peptídeo nanoencapsulado (e em sua forma livre) sobre o grau de degeneração da via nigroestriatal; a capacidade motora e assimetria dos membros anteriores; além de investigarmos as alterações morfológicas da SNpc.

Quando avaliado o comprometimento motor, foi possível perceber que todos os animais tiveram uma redução na latência de queda logo no primeiro teste do equipamento RotaRod (figura 9). Além disso, foi possível observar que o tratamento com a Neurovespina em sua forma livre (grupo Neurovespina) resultou em um aumento estatístico significativo (em dois dos três dias de ensaio) na qual os sujeitos foram testados, ou seja, resultou em diminuição do comprometimento motor induzido pela toxina. Esses dados corroboram estudos anteriores de nosso grupo, indicando o potencial do peptídeo na redução de alterações locomotoras produzidas pela 6-OHDA(57). Contudo, quando avaliado a ação do peptídeo nanoencapsulado no teste motor, não foi obtido aumento estatístico significativo. Tal resultado pode indicar que a entrega do peptídeo nanoencapsulado precise de um maior período de tratamento, uma vez que neste trabalho inicial, o protocolo estabelecido seja de 8 dias. Além disso, cabe destacar que em trabalhos anteriores de nosso grupo uma curva dose-resposta já tinha sido realizada, onde a dose com melhor desempenho nos sujeitos foi administrada no presente estudo.

Além disso, é importante ressaltar que a administração do nanossistema foi realizada através de injeção subcutânea, considerada uma via de entrega mais usual para a entrega de outras substâncias, como por exemplo de antígenos, uma vez que estes podem drenar diretamente do local da injeção para os linfonodos, onde as células imunocompetentes residem e onde a imunidade adaptativa é iniciada(87). Já para o SNC a administração de nanopartículas, em especial as estruturadas por meio de quitosana; o meio mais comumente utilizado é o intranasal, onde partículas carregadas com fármacos e com tamanho inferior a 200 nm, configura-se como uma

estratégia promissora para o tratamento de doenças(88). Entretanto, visando testar a eficácia do nanossistema em um meio de administração ainda não utilizado em nosso grupo, além reduzir o uso de anestésicos necessários para a administração intranasal da nanopartícula, este trabalho visou a utilização de um único modo de aplicação dos tratamentos, otimizando o tempo e avaliando a via subcutânea como mecanismo de administração. Vale destacar que o peptídeo Neurovespina na dose utilizada (4mg/kg) foi utilizada por Campos (57) e demonstrou considerável eficácia em reduzir o comprometimento motor em camundongos, alcançando uma latência média máxima (em relação à permanência total permitida aos animais no aparelho) de 58,8%, enquanto os sujeitos que tiveram a lesão com 6-OHDA e receberam salina como tratamento, tiveram apenas 8,4% de latência média máxima. No presente trabalho os animais que receberam o peptídeo Neurovespina apresentaram uma latência média máxima de 57,7%; já os animais do grupo controle lesão apresentaram uma porcentagem de 16,53%. Além disso, em outra pesquisa importante, sobre epilepsia, a Neurovespina foi capaz de diminuir a frequência, duração e gravidade de crises epiléticas(89). Assim, além destes resultados positivos, o estudo também despertou interesse na utilização da nanoemulsões como veículo para o neuropeptídeo neurovespina, dado que o peptídeo livre possui uma meia-vida estimada de 4 horas e sua administração inicialmente estudada requer administração na forma parenteral.

Com relação a avaliação do teste do cilindro, não foi observada diferença estatística significativa quando analisados o coeficiente de assimetria (assimetria geral) nos sujeitos. Cabe destacar, que o teste de assimetria foi desenvolvido para avaliar a quantidade de movimento do animal relacionado ao uso do membro superior comprometido em decorrência da lesão encefálica, aqui induzida por 6-OHDA. No cálculo de assimetria utilizado neste trabalho, todos os grupos tenderam a explorar o ambiente com ambos os membros anteriores de forma quase simétrica, onde foram obtidos valores do coeficiente de assimetria em torno de aproximadamente 50% (figura 11). Com exceção do grupo controle lesão, que apresentou um coeficiente abaixo desse valor, porém, sem significância estatística presente. Quando avaliada a porcentagem de toques com os dois membros simultaneamente na parede do cilindro, foram obtidos resultados que demonstram que a lesão nos grupos que receberam a 6-OHDA diminuiu a utilização de ambas as patas dianteiras em comparação com o grupo *sham*, indicando a capacidade desse

modelo em gerar danos motores finos, corroborando achados da literatura(80).

Nesse sentido, é possível pontuar que algumas variações nos ensaios, além do uso de diferentes protocolos utilizados para calcular os valores de assimetria, e o não estabelecimento rotineiro deste ensaio no laboratório, podem ter prejudicado as comparações dos resultados obtidos aqui com publicações prévias. Porém, no que diz respeito a assimetria de toque no cilindro com ambos os membros, foram observadas respostas motoras favoráveis aos já realizados em modelos de roedores hemiparkinsonianos(90). Assim, destaca-se que o teste de assimetria pode ser sensível à uma ampla variedade de níveis de depleção de dopamina, e pode ajudar a entender o mecanismo de alteração motora apresentado na DP(91).

Logo após a etapa de avaliação dos testes comportamentais, foi iniciado o protocolo de marcação imunohistoquímica da enzima tirosina hidroxilase, para avaliar a presença de neurônios dopaminérgicos na região da VTA, da SNpc e das projeções dopaminérgicas na região do estriado, esta, por meio de densidade ótica estriatal. Quando avaliados os neurônios THr remanescentes (porcentagem em relação ao lado contralateral) da VTA+SNpc, e os da SNpc (separada), foi observada diferença estatística significativa somente nos grupos NANONeuro e controle lesão, em relação ao controle *Sham* (figura 16). Contudo, cabe enfatizar que embora o grupo tratado com o peptídeo Neurovespina na forma livre não tenha divergido estatisticamente do grupo controle lesão ($p=0,3362$), é notória a diferença na quantidade de neurônios remanescentes, corroborando estudos prévios da ação neuroprotetora do peptídeo em neurônios dopaminérgicos, na dose administrada (57). Cabe destacar ainda, que Área Tegmentar Ventral (VTA) é uma região de interesse importante, uma vez que ela também abriga neurônios dopaminérgicos, e está anatomicamente próxima a SN, sendo correlacionada a comportamentos de recompensa e adicção (92). Além disso, ao se comparar o número de neurônios do lado ipsilateral com o lado contralateral a lesão (dentro de cada grupo experimental), os únicos grupos que não diferiram estatisticamente foram os grupos Neurovespina e *Sham*, corroborando a ação potencialmente neuroprotetora de neurônios dopaminérgicos por meio do neuropeptídeo (na forma livre), devido a número similar de neurônios apresentados entre o lado ipsilateral e contralateral do grupo citado.

Quando realizada a análise de Densidade Ótica estriatal, foi possível perceber que ocorreu uma diferença estatística significativa somente entre as médias (porcentagem em relação ao contralateral) do grupo lesão e do grupo *Sham*. Dessa

forma, nenhum dos tratamentos parece ter resultado em maior densidade do que a do controle lesão. Portanto, regeneração estriatal não foi estabelecida, ou não houve elevação dos níveis de dopamina no estriado, indicando que a neuroproteção e a modesta melhora na performance motora não foi acompanhada de uma restituição da enzima dos terminais axonais na região do estriado. Nesse sentido, corroborando os resultados aqui discutidos, experimentos com lesão por 6-OHDA e infusão intracerebral de GDNF (fator neutrófico derivado de células da glia) foram descritos, e indicaram que a administração desta substância diretamente na SN acarreta em neuroproteção da SN, porém não desenvolve reinervação estriatal(93)(94). Assim, existe a hipótese de que neste trabalho possa ter ocorrido neuroproteção da SN sem haver benefício em seus terminais axonais. Uma outra possibilidade é variação durante o processamento das imagens no software. Existiu certa proximidade entre as regiões estriatais cujas densidades óticas foram analisadas e o local de infusão de 6-OHDA, o que poderia nivelar os níveis de densidade dos animais tratados próximos aos dos controles, já que nessa região é esperada uma maior degeneração. Dessa forma, a análise de diferentes regiões do estriado no sentido rostro-caudal poderia revelar diferentes resultados quanto a imunorreatividade estriatal.

O modelo de lesão da via nigroestriatal por 6-OHDA é comumente utilizado acerca da neuropatologia envolvida na DP, como alterações moleculares, celulares e comportamentais(95,96). Além disso, é sabido que a ativação microglial representa importante aspecto da morte celular em decorrência da ação neurotóxica da 6-OHDA, sendo amplamente associada à patologia da DP(97,98). Nesse contexto, a escolha de se utilizar um modelo que envolva injeção intraestriatal de 6-OHDA se faz importante também por apresentar baixa taxa de mortalidade e possuir um curso de degeneração gradativo e retrógrado, sendo possível testar as intervenções terapêuticas, na medida em que a morte neuronal e ativação glial ocorrem de maneira progressiva(99,100).

Nesse sentido, alguns compostos derivados de toxinas de animais têm sido estudados como potenciais fármacos com efeitos neuroprotetores e antiparkinsonianos, como por exemplo, a Fraternina. Esse peptídeo é extraído da peçonha da vespa *Parachartergus fraternus* com 24 resíduos de aminoácidos. O peptídeo Fraternina, isolado diretamente da peçonha, apresentou um efeito neuroprotetor dose-dependente e foi capaz de evitar a degeneração de neurônios da

via nigroestriatal, após a indução da DP pela administração da neurotoxina 6-OHDA em camundongos(101). Além disso, em outro trabalho importante, esse mesmo peptídeo e seus análogos estudados mantiveram o efeito antiparkinsoniano e a integridade dos neurônios dopaminérgicos, com ação possivelmente anti-inflamatória(102). Outro peptídeo que tem sido avaliado como tratamento neuroprotetor é o Exenatide, nome dado à versão sintética do peptídeo exendina-4, o qual foi isolado do veneno na saliva do réptil *Heloderma suspectum* (conhecido como Monstro de Gila). O Exenatide é uma agonista do receptor GLP1r (receptor do peptídeo 1 similar a glucagon) e é comercialmente utilizado no tratamento de diabetes, sendo capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica e administrado por via subcutânea. Esse peptídeo teve demonstrada atividade neuroprotetora em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA(103), estando associado a diversos mecanismo de ação tais como atividade neurotrófica, anti-inflamatória e pró-mitocondrial(104). Além disso, o Exenatide foi testado em um ensaio piloto com 45 pacientes com DP, tratados durante 12 meses, se demonstrando tolerável e bastante promissor como droga antiparkinsoniana(104).

Outra peçonha de origem animal que tem sido bastante estudada é a toxina extraída da vespa eusocial *Polybia occidentalis*. Em estudo realizado por Mortari e colaboradores(56) com compostos da peçonha desse invertebrado, observou-se um efeito anti-convulsivante em modelos de crises epiléticas. A partir desses trabalhos, foi identificado um peptídeo neuroativo denominado occidentalina-1202, que desempenhou efeito anticonvulsivante em ratos(55). Nesse sentido, de Amaral(105) em pesquisa que testou os efeitos neuroprotetores e antiparkinsonianos da occidentalina-1202, relatou que o tratamento com o peptídeo foi capaz de desempenhar proteção em neurônios dopaminérgicos da SNpc de camundongos (em modelo com lesão intraestriatal por 6-OHDA) de maneira suficiente para melhorar o desempenho motor dos animais de forma progressiva, apresentando boa tolerabilidade quando administrada por via subcutânea. Além disso, uma característica que tornou o peptídeo ainda mais interessante é a sua capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica(105).

O peptídeo sintético Neurovespina é modificado a partir da Occidentalina - 1202, entretanto, permanece desconhecido o seu mecanismo de ação, existindo várias possibilidades para o seu efeito em diversos alvos moleculares(55). Contudo, devido a inexistência de tratamentos comprovadamente neuroprotetores aprovados

para o tratamento de portadores da patologia, experimentos que visam a identificar novas substâncias com perfil neuroprotetor são de extrema importância para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento da DP. Dentro deste contexto, compostos derivados de toxinas de animais, tal como a Neurovespina, representam uma diversa gama de possibilidades. Além disso, o neuropeptídeo Neurovespina já tem patenteado (e em fase de testes) seu uso para tratamento em epilepsia canina, demonstrando uma variedade de aplicações, e podendo apresentar variado espectro de indicações no futuro. Por outro lado, o peptídeo nanoencapsulado está em fases iniciais de pesquisa e já apresenta um elevado potencial de atividade.

Em trabalho recente e ainda não publicado de nosso grupo, o peptídeo livre foi comparado ao nanoencapsulado em um modelo de epilepsia do lobo frontal, e ambos apresentaram redução significativa na frequência das crises espontâneas e recorrentes (CER), ao longo de todo o período do estudo. Acredita-se que existe um possível aumento do tempo de ação do peptídeo quando associado a nanoemulsão carreadora, demonstrando tratamento potencialmente mais eficaz e confortável para esse modelo de epilepsia resistente a fármacos.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que Neurovespina em sua forma livre foi capaz de diminuir o comprometimento motor avaliado no teste do RotaRod induzido pela toxina 6-OHDA, corroborando com estudos anteriores. Porém, não foi possível observar diferença significativa na diminuição do comprometimento motor no RotaRod no grupo tratado com a Neurovespina nanoencapsulada, embora possa ter indícios de melhora substancial ao longo dos dias de tratamento.

Não foi observada diferença significativa entre os grupos quando avaliado o coeficiente de assimetria (teste do cilindro), apesar do grupo Controle lesão (6-OHDA) ter demonstrado menor porcentagem de toques com ambas as patas quando comparado com o grupo *Sham*.

A comparação da presença de neurônios imunorreativos anti-TH podem indicar uma possível neuroproteção do grupo tratado com o peptídeo Neurovespina em sua forma livre, quando avaliado o lado cerebral lesionado com o sadio.

Os resultados obtidos com a Neurovespina (em sua forma livre) e a Neurovespina associada a um nanossistema carreador no modelo murino da Doença de Parkinson por infusão intraestriatal de 6-OHDA, apontam para um potencial efeito neuroprotetor e antiparkinsoniano do neuropeptídeo. Assim, estudos adicionais com a Neurovespina nanoencapsulada em roedores (e futuramente em outras espécies experimentais) se tornam essenciais, em especial para estabelecer o melhor meio de administração, elucidar o seu mecanismo de ação, e para a avaliação de novos regimes de tratamento que aumentem a biodisponibilidade do peptídeo em diferentes protocolos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. dos Santos LMP, Cecato JF, Martinelli JE. Relevant factors on cognitive performance in patients with Parkinson's Disease: data of Jundiaí Institute of Geriatrics and Gerontology. *Perspectivas Médicas*. 2013 Jul 1;24(1):24–30.
2. Redmond DE, Weiss S, Elsworth JD, Roth RH, Wakeman DR, Bjugstad KB, et al. Cellular Repair in the Parkinsonian Nonhuman Primate Brain.
3. Johnson KE. Approach to the patient with Parkinson disease. *Prim Care* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2024 Jun 29];42(2):205–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25979582/>
4. Rafferty MR, Prodoehl J, Robichaud JA, David FJ, Poon C, Goelz LC, et al. Effects of 2 years of exercise on gait impairment in people with Parkinson Disease: The PRET-PD randomized trial. *Journal of Neurologic Physical Therapy* [Internet]. 2017 [cited 2024 Jun 29];41(1):21–30. Available from: https://journals.lww.com/jnpt/fulltext/2017/01000/effects_of_2_years_of_exercise_on_gait_impairment.5.aspx
5. Kim JH, Lee JU, Kim MY, Kim IH, Kim B, Kim J. A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. *Arch Neurol* [Internet]. 1993 [cited 2024 Jul 24];50(10):140–8. Available from: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573950401119871616>
6. Shanahan J, Morris ME, Bhriain ON, Saunders J, Clifford AM. Dance for People With Parkinson Disease: What Is the Evidence Telling Us? *Arch Phys Med Rehabil*. 2015 Jan 1;96(1):141–53.
7. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, *Projeção da População do Brasil por sexo e idade: 2000-2060*. 2018.
8. Mônica de Oliveira Souto. *Era outono em Barcelona: o meu encontro com Mr. Parkinson*. Niterói/Rio de Janeiro: Pathernon; 2009.

9. Terao Y, Fukuda H, Ugawa Y, Hikosaka O. New perspectives on the pathophysiology of Parkinson's disease as assessed by saccade performance: A clinical review. *Clinical Neurophysiology*. 2013 Aug 1;124(8):1491–506.
10. Schapira AHV. Neurobiology and treatment of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci [Internet]*. 2009 Jan [cited 2024 Jul 3];30(1):41–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19042040/>
11. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou MF, Benabid AL, Sadoul R, et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2001 Oct 1;65(2):135–72.
12. Mazzoni P, Shabbott B, Cortés JC. Motor Control Abnormalities in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]*. 2012 Jun 1 [cited 2024 Jul 24];2(6):a009282. Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/2/6/a009282.full>
13. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, et al. Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers* 2017 3:1 [Internet]. 2017 Mar 23 [cited 2024 Jul 24];3(1):1–21. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrdp201713>
14. Szatmari S, Illigens BMW, Siepmann T, Pinter A, Takats A, Bereczki D. Neuropsychiatric symptoms in untreated parkinson's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat [Internet]*. 2017 Mar 16 [cited 2024 Jul 24];13:815–26. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=dndt20>
15. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry [Internet]*. 2008 Apr 1 [cited 2024 Jul 24];79(4):368–76. Available from: <https://jnnp.bmj.com/content/79/4/368>

16. Nicaretta DH, Pereira JS, Pimentel ML. Distúrbios autonômicos na doença de Parkinson. *Rev Assoc Med Bras* [Internet]. 1998 [cited 2024 Jul 24];44(2):120–2. Available from: <https://www.scielo.br/j/ramb/a/8KFbwDpsyZQtrC5mQ9qh97h/>
17. Doença NA, Parkinson DE, Maria M, Mello A, Galhardo C, Karênina De Freitas Jordão Do Amaral A. Caracterização dos distúrbios cognitivos na Doença de Parkinson. *Revista CEFAC* [Internet]. 2009 [cited 2024 Jul 24];11(suppl 2):251–7. Available from: <https://www.scielo.br/j/rcefac/a/d5hd4ydqtYXyZGnnMgcPRgk/>
18. Taylor KSM, Cook JA, Counsell CE. Heterogeneity in male to female risk for Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2007 Aug 1 [cited 2024 Jul 24];78(8):905–6. Available from: <https://jnnp.bmj.com/content/78/8/905>
19. Litim N, Morissette M, Di Paolo T. Neuroactive gonadal drugs for neuroprotection in male and female models of Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016 Aug 1;67:79–88.
20. Carneiro L dos A. Avaliação da atividade antiepiléptica e da expressão neuronal de c-fos de dois peptídeos sintetizados a partir da Occidentalina-1202 isolada da vespa social *Polybia occidentalis*. 2013 Feb 21 [cited 2024 Jul 24]; Available from: <http://repositorio2.unb.br/jspui/handle/10482/13260>
21. Maiti P, Manna J, Dunbar GL, Maiti P, Dunbar GL. Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. *Translational Neurodegeneration* 2017 6:1 [Internet]. 2017 Oct 25 [cited 2024 Jul 24];6(1):1–35. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s40035-017-0099-z>
22. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, De Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003 Mar 1;24(2):197–211.
23. Bloem BR, Stocchi F. Move for Change Part I: a European survey evaluating the impact of the EPDA Charter for People with Parkinson's disease. *Eur J Neurol*

[Internet]. 2012 Mar 1 [cited 2024 Jun 29];19(3):402–10. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1468-1331.2011.03532.x>

24. Balestrino R, Schapira AHV. Parkinson disease. *Eur J Neurol* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2024 Jul 24];27(1):27–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ene.14108>

25. Béraud D, Hathaway HA, Trecki J, Chasovskikh S, Johnson DA, Johnson JA, et al. Microglial Activation and Antioxidant Responses Induced by the Parkinson's Disease Protein α -Synuclein. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 2012 8:1 [Internet]. 2012 Oct 10 [cited 2024 Jul 24];8(1):94–117. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11481-012-9401-0>

26. Reynolds AD, Stone DK, Mosley RL, Gendelman HE. Nitrated α -Synuclein-Induced Alterations in Microglial Immunity Are Regulated by CD4+ T Cell Subsets. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2024 Jul 24];182(7):4137–49. Available from: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0803982>

27. Zhang W, Phillips K, Wielgus AR, Liu J, Albertini A, Zucca FA, et al. Neuromelanin activates microglia and induces degeneration of dopaminergic neurons: Implications for progression of parkinson's disease. *Neurotox Res* [Internet]. 2011 Jan 3 [cited 2024 Jul 24];19(1):63–72. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12640-009-9140-z>

28. Su X, Maguire-Zeiss KA, Giuliano R, Prifti L, Venkatesh K, Federoff HJ. Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2008 Nov 1;29(11):1690–701.

29. Blesa J, Trigo-Damas I, Dileone M, del Rey NLG, Hernandez LF, Obeso JA. Compensatory mechanisms in Parkinson's disease: Circuits adaptations and role in disease modification. *Exp Neurol*. 2017 Dec 1;298:148–61.

30. Gertler TS, Chan CS, Surmeier DJ. Dichotomous Anatomical Properties of Adult Striatal Medium Spiny Neurons. *Journal of Neuroscience* [Internet]. 2008 Oct 22

[cited 2024 Jul 24];28(43):10814–24. Available from: <https://www.jneurosci.org/content/28/43/10814>

31. Quiroga-Varela A, Walters JR, Brazhnik E, Marin C, Obeso JA. What basal ganglia changes underlie the parkinsonian state? The significance of neuronal oscillatory activity. *Neurobiol Dis.* 2013 Oct 1;58:242–8.

32. Mink JW. The Basal Ganglia: Focused Selection And Inhibition Of Competing Motor Programs. *Prog Neurobiol.* 1996 Nov 1;50(4):381–425.

33. Nambu A, Tachibana Y, Kaneda K, Tokuno H, Takada M. Dynamic Model of Basal Ganglia Functions and Parkinson's Disease. *The Basal Ganglia VIII* [Internet]. 2005 Jun 26 [cited 2024 Jul 24];307–12. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/0-387-28066-9_28

34. Hammond C, Bergman H, Brown P. Pathological synchronization in Parkinson's disease: networks, models and treatments. *Trends Neurosci* [Internet]. 2007 Jul 1 [cited 2024 Jul 24];30(7):357–64. Available from: <http://www.cell.com/article/S0166223607001233/fulltext>

35. Takakusaki K, Saitoh K, Harada H, Kashiwayanagi M. Role of basal ganglia–brainstem pathways in the control of motor behaviors. *Neurosci Res.* 2004 Oct 1;50(2):137–51.

36. Nambu A, Tokuno H, Takada M. Functional significance of the cortico–subthalamo–pallidal 'hyperdirect' pathway. *Neurosci Res.* 2002 Jun 1;43(2):111–7.

37. Turner RS, Desmurget M. Basal ganglia contributions to motor control: a vigorous tutor. *Curr Opin Neurobiol.* 2010 Dec 1;20(6):704–16.

38. Alves LA, Coelho AC, Brunetto AF. Fisioterapia respiratória na doença de parkinson idiopática: relato de caso. *Fisioterapia e Pesquisa* [Internet]. 2005 Dec 31 [cited 2024 Jun 29];12(3):46–9. Available from: <https://www.revistas.usp.br/fpusp/article/view/76717>

39. Nicholson G, Pereira AC, Hall GM. Parkinson's disease and anaesthesia. *BJA: British Journal of Anaesthesia* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2024 Jun 29];89(6):904–16. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/bja/aef268>
40. Bastos VH. Analysis of pneumofunctional parameters in patients with Parkinson's disease: pilot study. [cited 2024 Jun 29]; Available from: <https://www.researchgate.net/publication/264417746>
41. Obeso JA, Olanow CW, Nutt JG. Levodopa motor complications in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* [Internet]. 2000 Oct 1 [cited 2024 Jun 29];23(10 SUPPL.):S2–7. Available from: <http://www.cell.com/article/S1471193100000318/fulltext>
42. Wei YJJ, Stuart B, Zuckerman IH. Use of antiparkinson medications among elderly Medicare beneficiaries with Parkinson's disease. *Am J Geriatr Pharmacother*. 2010 Aug 1;8(4):384–94.
43. Schapira AHV, Bezard E, Brotchie J, Calon F, Collingridge GL, Ferger B, et al. Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. *Nature Reviews Drug Discovery* 2006 5:10 [Internet]. 2006 Oct [cited 2024 Jun 29];5(10):845–54. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrd2087>
44. Isaacson SH, Hauser RA. Review: Improving symptom control in early Parkinson's disease. <http://dx.doi.org/10.1177/1756285609339383> [Internet]. 2009 Aug 14 [cited 2024 Jun 29];2(6):393–400. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1756285609339383>
45. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* [Internet]. 2003 Sep 11 [cited 2024 Jul 24];39(6):889–909. Available from: <http://www.cell.com/article/S0896627303005683/fulltext>
46. de Meira Santos Lima M, Braga Reksidler A, Marques Zanata S, Bueno Machado H, Tufik S, Vital MABF. Different parkinsonism models produce a time-

dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. *Brain Res.* 2006 Jul 26;1101(1):117–25.

47. Tadaiesky MT, Dombrowski PA, Figueiredo CP, Cargnin-Ferreira E, Da Cunha C, Takahashi RN. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2008 Oct 28;156(4):830–40.

48. Luthman J, Fredriksson A, Lewander T, Jonsson G, Archer T. Effects of d-amphetamine and methylphenidate on hyperactivity produced by neonatal 6-hydroxydopamine treatment. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 1989 Dec [cited 2024 Jul 24];99(4):550–7. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00589907>

49. Teismann P, Tieu K, Choi DK, Wu DC, Naini A, Hunot S, et al. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003 Apr 29 [cited 2024 Jul 24];100(9):5473–8. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0837397100>

50. Meredith GE, Sonsalla PK, Chesselet MF. Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2008 Apr 14 [cited 2024 Jul 24];115(4):385–98. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00401-008-0350-x>

51. Luan LT, Man N V, Huong NT, Anh DD, Van Trang N, Hanh TB, et al. Advances in research on Rotavin-M1. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering* [Internet]. 2017 [cited 2024 Jul 24];60(1):43–8. Available from: <http://jnnp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jnnp.68.2.256>

52. Glinka Y, Gassen M, Youdim MBH. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity BT - *Advances in Research on Neurodegeneration*. Riederer P, Calne DB, Horowski R, Mizuno Y, Poewe W, Youdim MBH, editors. 1997;55–66.

53. Gerlach M, Riederer P. Animal models of Parkinson's disease: An empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm*

[Internet]. 1996 [cited 2024 Jul 24];103(8–9):987–1041. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01291788>

54. Ungerstedt U, Arbuthnott GW. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* 1970 Dec 18;24(3):485–93.

55. Mortari MR, Santos WF dos. Atividade neurobiológica e caracterização química da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis* (Hymenoptera, Vespidae): identificação de peptídeos antinociceptivos e anticonvulsivantes [Internet]. 2007 [cited 2024 Jul 24]. Available from: <https://repositorio.usp.br/item/001572951>

56. Mortari MR, Siqueira Cunha AO, De Oliveira L, Vieira EB, Gelfuso EA, Coutinho-Netto J, et al. Anticonvulsant and Behavioural Effects of the Denatured Venom of the Social Wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae). *Basic Clin Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2005 Nov 1 [cited 2024 Jul 24];97(5):289–95. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1742-7843.2005.pto_137.x

57. Avohay G, Mortari MR. Avaliação da ação antiparkinsoniana do peptídeo Neurovespina no modelo murino da Doença de Parkinson [Dissertação de Mestrado - Biologia Animal]. [Brasília, Brasil]: Universidade de Brasília; 2016.

58. *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications* - Google Livros [Internet]. [cited 2024 Jul 24]. Available from: https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=HGp_CwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA337&dq=NAFISI,+S.%3B+MAIBACH,+H.+I.+Nanotechnology+in+cosmetics.+Cosmetic+Science+and+Technology:+The+oretical+Principles+and+Applications,+v.+85,+p.+337%E2%80%93361,+2017.&ots=DY-QAUrnDU&sig=yWKOOrnr16f8417sr1VnyXZmwXps#v=onepage&q&f=false

59. Hamad AF, Han JH, Kim BC, Rather IA. The intertwine of nanotechnology with the food industry. *Saudi J Biol Sci.* 2018 Jan 1;25(1):27–30.

60. de Oliveira JL, Campos EVR, Bakshi M, Abhilash PC, Fraceto LF. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. *Biotechnol Adv.* 2014 Dec 1;32(8):1550–61.
61. Zhang RX, Li J, Zhang T, Amini MA, He C, Lu B, et al. Importance of integrating nanotechnology with pharmacology and physiology for innovative drug delivery and therapy – an illustration with firsthand examples. *Acta Pharmacologica Sinica* 2018 39:5 [Internet]. 2018 Apr 26 [cited 2024 Jul 24];39(5):825–44. Available from: <https://www.nature.com/articles/aps201833>
62. Leso V, Fontana L, Iavicoli I. Biomedical nanotechnology: Occupational views. *Nano Today.* 2019 Feb 1;24:10–4.
63. Essential Oils and Nanotechnology for Treatment of Microbial Diseases - Google Livros [Internet]. [cited 2024 Jul 24]. Available from: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=10k4DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1905&dq=RAI,+M.%3B+ZACCHINO,+S.%3B+DERITA,+M.+G.+Essential+Oils+and+Nanotechnology+for+Treatment+os+Microbial+Diseases.+%5Bs.l.%5D+2017,+2017.&ots=XMP2EJ6lil&sig=uu9q--jclMDgx63tjgITsdlmBeY#v=onepage&q&f=false>
64. Swar S, Makova V, Stibor I. Effectiveness of Diverse Mesoporous Silica Nanoparticles as Potent Vehicles for the Drug L-DOPA. *Materials* 2019, Vol 12, Page 3202 [Internet]. 2019 Sep 30 [cited 2024 Jul 24];12(19):3202. Available from: <https://www.mdpi.com/1996-1944/12/19/3202/htm>
65. Morales V, McConnell J, Pérez-Garnes M, Almendro N, Sanz R, García-Muñoz RA. L-Dopa release from mesoporous silica nanoparticles engineered through the concept of drug-structure-directing agents for Parkinson’s disease. *J Mater Chem B* [Internet]. 2021 May 26 [cited 2024 Jul 24];9(20):4178–89. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/tb/d1tb00481f>

66. Zhu R, Wang Z, Liang P, He X, Zhuang X, Huang R, et al. Efficient VEGF targeting delivery of DOX using Bevacizumab conjugated SiO₂@LDH for anti-neuroblastoma therapy. *Acta Biomater*. 2017 Nov 1;63:163–80.
67. Bi CC, Wang AP, Chu YC, Liu S, Mu HJ, Liu WH, et al. Intranasal delivery of rotigotine to the brain with lactoferrin-modified PEG-PLGA nanoparticles for Parkinson's disease treatment. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2016 Dec 7 [cited 2024 Jul 24];11:6547–59. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=dijn20>
68. Martinez-Fong D, Bannon MJ, Trudeau LE, Gonzalez-Barrios JA, Arango-Rodriguez ML, Hernandez-Chan NG, et al. NTS-Polyplex: a potential nanocarrier for neurotrophic therapy of Parkinson's disease. *Nanomedicine*. 2012 Oct 1;8(7):1052–69.
69. Herrán E, Requejo C, Ruiz-Ortega JA, Aristieta A, Igartua M, Bengoetxea H, et al. Increased antiparkinson efficacy of the combined administration of VEGF- and GDNF-loaded nanospheres in a partial lesion model of Parkinson's disease. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2014 May 27 [cited 2024 Jul 24];9(1):2677–87. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=dijn20>
70. Shin M, Kim HK, Lee H. Dopamine-loaded poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) microspheres: New strategy for encapsulating small hydrophilic drugs with high efficiency. *Biotechnol Prog* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2024 Jul 24];30(1):215–23. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/btpr.1835>
71. de Lima LS, Mortari MR. Therapeutic nanoparticles in the brain: A review of types, physicochemical properties and challenges. *Int J Pharm*. 2022 Jan 25;612:121367.
72. Alberto MR. Relatórios de Estágio e Monografia Intitulada "Nanopartículas intranasais para o tratamento da depressão e ansiedade". Relatórios de Estágio e Monografia Intitulada "Nanopartículas intranasais para o tratamento da depressão e

ansiedade" [Internet]. 2023 Mar 6 [cited 2024 Jul 24]; Available from: <https://estudogeral.uc.pt/handle/10316/105735>

73. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci*. 2006 Jul 1;31(7):603–32.

74. Ravi Kumar MNV. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym*. 2000 Nov 1;46(1):1–27.

75. Dakwar GR, Hammad IA, Popov M, Linder C, Grinberg S, Heldman E, et al. Delivery of proteins to the brain by bolaamphiphilic nano-sized vesicles. *Journal of Controlled Release*. 2012 Jun 10;160(2):315–21.

76. Feng Y, He H, Li F, Lu Y, Qi J, Wu W. An update on the role of nanovehicles in nose-to-brain drug delivery. *Drug Discov Today*. 2018 May 1;23(5):1079–88.

77. Wang J, Chang K, De RO, Costa A, Passos TS, Mikaelly E, et al. Encapsulated peptides and proteins with an effect on satiety. *Nanomaterials* [Internet]. 2023 Apr 1 [cited 2024 Jul 24];13(7). Available from: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/53200>

78. da Conceição FSL, Ngo-Abdalla S, Houzel JC, Rehen SK. Murine Model for Parkinson's Disease: from 6-OH Dopamine Lesion to Behavioral Test. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* [Internet]. 2010 Jan 15 [cited 2024 Jun 29];(35):e1376. Available from: <https://www.jove.com/v/1376/murine-model-for-parkinson-s-disease-from-6-oh-dopamine-lesion-to>

79. Smith GA, Heuer A. 6-OHDA Toxin Model in Mouse. *Neuromethods* [Internet]. 2011 [cited 2024 Jun 29];61:281–97. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61779-298-4_14

80. Woodlee MT, Kane JR, Chang J, Cormack LK, Schallert T. Enhanced function in the good forelimb of hemi-parkinson rats: Compensatory adaptation for contralateral postural instability? *Exp Neurol*. 2008 Jun;211(2):511–7.

81. Vercammen L, Van der Perren A, Vaudano E, Gijsbers R, Debyser Z, Van den Haute C, et al. Parkin Protects against Neurotoxicity in the 6-Hydroxydopamine Rat Model for Parkinson's Disease. *Molecular Therapy* [Internet]. 2006 Nov 1 [cited 2024 Jun 29];14(5):716–23. Available from: <http://www.cell.com/article/S152500160600253X/fulltext>
82. Schallert T, Woodlee MT, Fleming SM. Disentangling multiple types of recovery from brain injury. *Pharmacology of Cerebral Ischemia* [Internet]. 2002 [cited 2024 Jul 3];201–16. Available from: <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=42c0f7fb695eee78026c829b075415d59efcc5f5>
83. Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nature Reviews Neuroscience* 2009 10:7 [Internet]. 2009 Jun 10 [cited 2024 Jun 29];10(7):519–29. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrn2652>
84. Sharlet T, Tillerson JL. Central nervous system diseases: innovative animal models from lab to clinic. 2000 [cited 2024 Jul 3]. p. 131–51 *Intervention Strategies for Degeneration of Dopamine Neurons in Parkinsonism*. Available from: https://sci-hub.se/10.1007/978-1-59259-691-1_8
85. Boix J, Padel T, Paul G. A partial lesion model of Parkinson's disease in mice – Characterization of a 6-OHDA-induced medial forebrain bundle lesion. *Behavioural Brain Research*. 2015 May 1;284:196–206.
86. Palha JA, Nissanov J, Fernandes R, Sousa JC, Bertrand L, Dratman MB, et al. Thyroid hormone distribution in the mouse brain: the role of transthyretin. *Neuroscience*. 2002 Sep 10;113(4):837–47.
87. Oussoren C, Storm G. Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001 Aug 23;50(1–2):143–56.

88. Rukmangathen R, Yallamalli IM, Yalavarthi PR. Formulation and biopharmaceutical evaluation of risperidone-loaded chitosan nanoparticles for intranasal delivery. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2019 Aug 3 [cited 2024 Jul 24];45(8):1342–50. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03639045.2019.1619759>
89. Carneiro L dos A, Mortari MR. Atividade antiepiléptica e neuroprotetora do peptídeo neurovespina em um modelo crônico de Epilepsia do Lobo Temporal e avaliação da sua toxicidade aguda em camundongos Swiss. [Tese de Doutorado]. [Brasília, Brasil]: Universidade de Brasília (UnB); 2017.
90. Woodlee MT, Kane JR, Chang J, Cormack LK, Schallert T. Enhanced function in the good forelimb of hemi-parkinson rats: Compensatory adaptation for contralateral postural instability? *Exp Neurol*. 2008 Jun 1;211(2):511–7.
91. Shi LH, Woodward DJ, Luo F, Anstrom K, Schallert T, Chang JY. High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus reverses limb-use asymmetry in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res*. 2004 Jul 2;1013(1):98–106.
92. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology* 2010 35:1 [Internet]. 2009 Aug 26 [cited 2024 Jul 25];35(1):217–38. Available from: <https://www.nature.com/articles/npp2009110>
93. Rosenblad C, Kirik D, Björklund A. Sequential Administration of GDNF into the Substantia Nigra and Striatum Promotes Dopamine Neuron Survival and Axonal Sprouting but Not Striatal Reinnervation or Functional Recovery in the Partial 6-OHDA Lesion Model. *Exp Neurol*. 2000 Feb 1;161(2):503–16.
94. Kirik D, Rosenblad C, Björklund A. Preservation of a functional nigrostriatal dopamine pathway by GDNF in the intrastriatal 6-OHDA lesion model depends on the site of administration of the trophic factor. *European Journal of Neuroscience* [Internet]. 2000 Nov 1 [cited 2024 Jul 25];12(11):3871–82. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1460-9568.2000.00274.x>

95. Carlsson T, Schindler FR, Höllerhage M, Depboylu C, Arias-Carrión O, Schnurrbusch S, et al. Systemic administration of neuregulin-1 β 1 protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2024 Jul 25];117(6):1066–74. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1471-4159.2011.07284.x>
96. Heuer A, Smith GA, Lelos MJ, Lane EL, Dunnett SB. Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice I: Motor impairments identify extent of dopamine depletion at three different lesion sites. *Behavioural Brain Research*. 2012 Mar 1;228(1):30–43.
97. Cicchetti F, Brownell AL, Williams K, Chen YI, Livni E, Isacson O. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *European Journal of Neuroscience* [Internet]. 2002 Mar 1 [cited 2024 Jul 25];15(6):991–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1460-9568.2002.01938.x>
98. Virgone-Carlotta A, Uhlrich J, Akram MN, Ressnikoff D, Chrétien F, Domenget C, et al. Mapping and kinetics of microglia/neuron cell-to-cell contacts in the 6-OHDA murine model of Parkinson's disease. *Glia* [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2024 Jul 25];61(10):1645–58. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/glia.22546>
99. Alvarez-Fischer D, Henze C, Strenzke C, Westrich J, Ferger B, Höglinger GU, et al. Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and α -synuclein-deleted mice. *Exp Neurol*. 2008 Mar 1;210(1):182–93.
100. Stott SRW, Barker RA. Time course of dopamine neuron loss and glial response in the 6-OHDA striatal mouse model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience* [Internet]. 2014 Mar 1 [cited 2024 Jul 25];39(6):1042–56. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ejn.12459>

101. Biolchi AM. Avaliação antiparkinsoniana e neuroprotetora do peptídeo Fraternina isolado da peçonha da vespa *Parachartergus fraternus* no modelo murino da Doença de Parkinson. [Brasília]: Universidade de Brasília; 2014.
102. Biolchi AM, Rodrigues De Oliveira DG, De Oliveira Amaral H, Avohay G, Campos A, Coimbra Gonçalves J, et al. toxins Fraternine, a Novel Wasp Peptide, Protects against Motor Impairments in 6-OHDA Model of Parkinsonism. [cited 2024 Aug 17]; Available from: www.mdpi.com/journal/toxins
103. Bertilsson G, Patrone C, Zachrisson O, Andersson A, Dannaeus K, Heidrich J, et al. Peptide hormone exendin-4 stimulates subventricular zone neurogenesis in the adult rodent brain and induces recovery in an animal model of parkinson's disease. *J Neurosci Res* [Internet]. 2008 Feb 1 [cited 2024 Aug 17];86(2):326–38. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jnr.21483>
104. Foltynie T, Aviles-Olmos I. Exenatide as a potential treatment for patients with Parkinson's disease: First steps into the clinic. *Alzheimer's & Dementia* [Internet]. 2014 [cited 2024 Aug 17];10(1 SUPPL.):S38–46. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.jalz.2013.12.005>
105. de Oliveira Amaral H, Márcia Renata Mortari D. Avaliação do efeito neuroprotetor da Occidentalina-1202 sobre o modelo de indução parkinsoniana em camundongos por 6-OHDA.

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO CEUA – UNB

Universidade de Brasília
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 23 de novembro de 2020.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**NOVOS FÁRMACOS NEUROPROTECTORES PARA A DOENÇA DE PARKINSON: PEPTÍDEOS ISOLADOS DA PEÇONHA DE VESPAS SOCIAIS LIVRES E ASSOCIADOS À NANOFORMULAÇÕES**", Protocolo n.º 032/2020 sob responsabilidade da Professora Márcia Renata Mortari, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Camundongos Swiss* (176 machos). A presente declaração é válida pelo período de: 23/11/2020 a 20/03/2025.

Dr. José Luiz Jivago de Paula Rôlo

Coordenador da CEUA – Unb



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