



Neuropharma
lab



**Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Departamento de Ciências Fisiológicas
Laboratório de Neurofarmacologia**

Avaliação neuroprotetora do peptídeo occidentalina-1202 em modelo murino da
Doença de Parkinson

HENRIQUE DE OLIVEIRA AMARAL

Brasília – DF, 2018



Neuropharma
lab



**Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Departamento de Ciências Fisiológicas
Laboratório de Neurofarmacologia**

Avaliação neuroprotetora do peptídeo occidentalina-1202 em modelo murino da
Doença de Parkinson

Trabalho de conclusão de curso submetido como
requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel
do Curso de Farmácia da Universidade de Brasília

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Renata Mortari

HENRIQUE DE OLIVEIRA AMARAL

Brasília – DF, 2018

Dedicatória

Dedico esse trabalho primeiramente à minha família, pelo apoio e incentivo. Ao meu pai, José Augusto, pela confiança, ensinamentos, amor e por sempre estar presente e me incentivar. À minha mãe, Bárbara, pelos conselhos e carinho, sempre me ajudando a superar os conflitos da vida. Aos meus irmãos, Déborah, Rafael e Jéssica, por me ensinarem sobre a vida e estarem sempre comigo nos momentos mais difíceis

*Clear the air, clean the sky, wash the
wind! Take the stone from the stone,
take the skin from the arm, take the
muscle from the bone, and wash
them. Wash the stone, wash the
bone, wash the brain, wash the soul,
wash them, wash them.*

T.S. Elliot, *Murder in the Cathedral*

Agradecimentos

À minha orientadora, Márcia, pela paciência, carinho, incentivo e por ser uma inspiração para mim.

À minha família, pelo amor e incentivo, sempre me ajudando a perseguir os meus sonhos.

Ao Iago Vieira do Nascimento Santos e Eduardo da Cruz Rios Sanchez, grandes amigos que sempre estiveram ao meu lado.

Aos amigos que tive o prazer de conhecer durante o curso de Farmácia, Dulce, Christian e Marina, que sempre me aconselharam e me ajudaram a crescer como pessoa.

Ao Danilo, técnico do departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Biologia, que dispôs do seu tempo para ajudar.

Ao Matheus, companheiro de experimentos que dispôs do seu tempo para ajudar.

A minha parceira de experimentos, Andreia, que teve participação essencial nessa minha jornada e no meu crescimento profissional.

Aos amigos e colegas do laboratório de neurofarmacologia, sempre construindo um ambiente de trabalho divertido, compartilhando todos os momentos e por serem pessoas atenciosas.

Aos professores que tive o prazer de conhecer durante o curso de Farmácia, pelos ensinamentos transmitidos ao longo desses 5 anos.

Lista de Figuras

- Figura 1: Procedimento neurocirúrgico. Em A: exposição do crânio e da linha do bregma. B: Lesão estriatal dopaminérgica com infusão de 40 µg/4µl de 6-OHDA diretamente no estriado esquerdo utilizando uma bomba de infusão com um fio de polietileno acoplado a uma seringa Hamilton de 10 µl (Biolchi, 2018).32
- Figura 2: Esquema ilustrativo do delineamento experimental utilizado para a administração dos peptídeos ou veículo em estudo. No primeiro dia, os animais receberam uma injeção intraestriatal de 40 µg/4µl de 6-OHDA. Os compostos foram administrados por via s.c. 1h, 72h e 120 h após a infusão de 6-OHDA (Biolchi, 2018).32
- Figura 3. Esquema geral ilustrativo do delineamento experimental. A administração dos peptídeos ou veículo em estudo e os ensaios comportamentais foram realizados durante os sete dias de experimento. No primeiro dia, os animais receberam uma injeção intraestriatal de 6-OHDA (40 ug/4 µl). O teste de permanência por 6 horas ocorreu no quinto dia após a lesão. No sétimo dia, foi realizado o teste de comportamento rotatório após desafio com a apomorfina seguindo para a histologia (Biolchi, 2018)34
- Figura 4 (Biolchi, 2018): Imagem demonstrativa para quantificação de neurônios reativos a TH na região da SN. Consideraram-se os neurônios que continham os citoplasmas que emitiam a fluorescência em verde (Sadio/Alexa flúor-488) e os núcleos marcados a partir de um meio de montagem Fluorescente Média com DAPI (Sadio/DAPI). Dupla marcação dos neurônios com citoplasmas em verde e núcleos em azul (Sadio/ Sobreposição).36
- Figura 5: Efeito dos tratamentos no teste de permanência 6 horas. Tempo em segundos que os animais permaneceram no Rotarod para 13 avaliações diferentes após a lesão. Grupos controles: 6- OHDA+ veículo (6-OHDA, n= 6) e grupo Sadio (Sadio, n = 8). Grupo OcTx-1202 (1 mg/kg (n=6), 2,5 mg/kg (n=8), 4mg/kg (n=6) Tratamentos com diferenças significativas **** (p < 0,0001) em relação ao grupo controle 6-OHDA (Two-way ANOVA: [F_(4,30) = 13,04; p<0,0001]).....40
- Figura 6: Comportamento rotatório após desafio com apomorfina (agonista dopaminérgico) injetado por via s.c. (5 ug/animal) em camundongos previamente injuriados com 6-OHDA. Grupos controles: 6-OHDA+ veículo (6-OHDA, n= 8) e Sadio (Sadio, n = 6). Grupo OcTx-1202 (1 mg/kg (n=6), 2,5 mg/kg (n=8), 4 mg/kg (n=7) Grupos com diferenças significativas ** (p < 0,01) em relação ao grupo controle 6-OHDA + Veículo (One-way ANOVA: [F_(4,30) = 9,254; p<0,0001]).....41
- Figura 7: Determinação pela porcentagem de neurônios dopaminérgicos viáveis imunoreativos a TH em fatias cerebrais da região SN. Grupos controles: 6-OHDA+ veículo (6-OHDA, n=8) e Sadio (Sadio, n=6). Grupo OcTx-1202 1 mg/kg (n=4), 2,5 mg/kg (n=8), 4mg/kg (n=6) Grupos com diferenças significativas ** (p < 0,01) em

relação ao grupo controle 6-OHDA + Veículo (One-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey [$F_{(4,29)}=4,606$; $p=0,0053$]).....42

Figura 8: Imagem representativa com marcação dos neurônios dopaminérgicos reativos a enzima TH. A: Grupo 6-OHDA (40 ug/animal) do lado sadio e em B neurônios imunomarcados do lado lesado; C: Grupo tratamento OcTx-1202 4 mg/kg com a imagem do lado sadio e em D do lado lesado.....43

Figura 9 Imagem representativa com marcação dos neurônios dopaminérgicos reativos a enzima TH. A: Grupo 6-OHDA (40ug/animal) do lado sadio e em B neurônios imunomarcados do lado lesado; C: Grupo tratamento OcTx-1202 2,5 mg/kg com a imagem do lado sadio e em D do lado lesado.44

Figura 10: Imagem representativa com marcação dos neurônios dopaminérgicos reativos a enzima TH. A: Grupo 6-OHDA (40ug/animal) do lado sadio e em B neurônios imunomarcados do lado lesado; C: Grupo tratamento OcTx-1202 1 mg/kg com a imagem do lado sadio e em D do lado lesado.45

Lista de Abreviaturas

AchE	Acetilcolinesterase
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato
ANOVA	Análise de variância
BHE	Barreira Hematoencefalica
CEUA	Comissão de Ética no Uso Animal
COMT	Catecol-O-metiltransferase
DP	Doença de Parkinson
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLP-1	Peptídeo-1 “glucagon-like”
L-Glu	Glutamato
MAO-B	Monoamina-oxidase B
NMDA	N-metil D-Aspartato
OcTx-1202	Occidentalina-1202
S.c	Via de administração subcutânea
SNpc	<i>Substantia nigra</i> região pars compacta
SNC	Sistema Nervoso Central
6-OHDA	6-hidroxidopamina

Sumário

1. Introdução.....	13
1.1 Histórico da Doença de Parkinson.....	13
1.2 Aspectos gerais da Doença de Parkinson.....	14
1.3 Neuropatologia da Doença de Parkinson.....	15
1.4 Mecanismos de neurodegeneração sugeridos na Doença de Parkinson.....	17
1.4.1 Neuroinflamação.....	17
1.4.2 Disfunção mitocondrial.....	18
1.4.3 Estresse oxidativo.....	19
1.4.4 Excitotoxicidade Glutamatérgica.....	20
1.4.5 Comprometimento do sistema de autofagia.....	21
1.5 Modelos animais da Doença de Parkinson.....	21
1.6 Tratamento farmacológico para a Doença de Parkinson.....	21
1.7 A peçonha de vespas.....	25
2. Objetivos.....	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3. Material e métodos.....	30
3.1 Determinação dos grupos experimentais.....	30
3.2 Procedimento cirúrgico para indução do hemiparkinsonismo em modelo murino de 6-OHDA.....	30
3.3 Administração das doses do peptídeo OcTx-1202.....	32
3.4 Ensaio comportamentais.....	32
3.4.1 Avaliação do desempenho motor no aparelho Rotarod.....	33
3.4.2 Ensaio de comportamento rotatório após desafio de apomorfina.....	33
3.5 Perfusão e histologia.....	34
3.6 Detecções pela técnica de imunohistoquímica.....	34
3.6.1 Avaliação da viabilidade de neurônios reativos a tirosina hidroxilase.....	35
3.6.2 Análise por microscopia de epifluorescência.....	35
3.7 Análise estatística.....	36
4. Resultados.....	39
4.1 Avaliação do desempenho motor no aparelho Rotarod.....	39
4.2 Avaliação do comportamento rotatório após desafio com apomorfina.....	40
4.3 Avaliação dos neurônios dopaminérgicos viáveis na região da Substância negra.....	41

5. Discussão	47
6. Conclusões	55
7. Referência Bibliográfica	56

Resumo

A Doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa e progressiva do Sistema Nervoso Central, caracterizada inicialmente pela perda seletiva de neurônios dopaminérgicos da região da *Substancia nigra* (SN). O principal tratamento da DP consiste na administração crônica do precursor da dopamina, a levodopa. No entanto, esse tratamento é apenas sintomático e não é capaz de interromper a progressão da doença. Devido a sua alta seletividade, peptídeos isolados da peçonha de vespas representam uma alternativa relevante como fármaco para o tratamento desta desordem. Estudos prévios realizados com o peptídeo Occidentalina-1202 (OcTx-1202), composto sintético com sequência idêntica ao natural, mostraram uma potente atividade antiepiléptica e neuroprotetora. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiparkinsoniana do peptídeo OcTx-1202 em três doses (1, 2,5 e 4 mg/kg) em um modelo murino de parkinsonismo. Para o modelo experimental, os animais foram divididos em três grupos experimentais: grupo 6-OHDA (animal com parkinsonismo e tratado com solução veículo), grupo OcTx-1202 (animal com parkinsonismo e tratado com o peptídeo) e grupo sadio (animal sadio e tratado com solução veículo). A administração da solução veículo e da OcTx-1202 foi realizada pela via subcutânea uma hora após o insulto com a 6-OHDA e em dois outros dias consecutivos. Os testes comportamentais realizados foram de alteração motora durante o período de 6 horas no aparelho Rotarod e comportamento rotatório após desafio com apomorfina. Em seguida, realizou-se uma avaliação imunohistoquímica para quantificação da proporção de neurônios viáveis na SN. Com relação a esse ensaio, o peptídeo não foi capaz de reduzir a morte neuronal. No entanto, no teste comportamental de alteração motora no Rotarod, os animais que receberam a dose de 4 mg/kg mostraram melhora na condição motora após 30 minutos depois do início do ensaio ($p < 0,0001$). Além disso, no teste de apomorfina, ambas as doses de 2,5 e 4 mg/kg diminuíram o número de giros ($p < 0,001$). Isso sugere que a OcTx-1202 possa estar agindo de forma a aliviar os sinais motores, porém os ensaios não demonstraram um efeito neuroprotetor significativo.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, Modelos animais, Peptídeos, peçonha de vespas, 6-hidroxidopamina e neuroproteção.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative and progressive disorder of the Central Nervous System, characterized initially by the selective loss of dopaminergic neurons in the *Substantia nigra* (SN) region. The main treatment for PD is chronic administration of the dopamine precursor, levodopa. However, this treatment is only symptomatic and is not able to interrupt the progression of the disease. Due to their high selectivity, peptides isolated from the venom of wasps represent a relevant alternative as a drug for this disorder. Previous studies using the peptide Occidentalina-1202 (OcTx-1202), a synthetic compound with a similar sequence to natural, showed potent antiepileptic and neuroprotective activity. The objective of this study was to evaluate the antiparkinsonian activity of the OcTx-1202 peptide in three doses (1, 2.5 and 4 mg / kg) in a murine PD model. For the experimental model, the animals were divided into three experimental groups: group 6-OHDA + vehicle (animal with parkinsonism and treated with vehicle solution), group OcTx-1202 (animal with parkinsonism and treated with the peptide) and healthy group (healthy animal and treated with carrier solution). Administration of the vehicle solution and OcTx-1202 was performed subcutaneously one hour after the insult with 6-OHDA and on two other consecutive days. The behavioral tests performed were motor alterations during the 6-hour period in the Rotarod apparatus and rotational behavior after administration of apomorphine. Subsequently, an immunohistochemical evaluation was performed to quantify the proportion of viable neurons in the SN. Regarding this assay, the peptide was not able to reduce neuronal death. However, in the behavioral motor impairment test in Rotarod, animals receiving the 4 mg / kg dose showed improvement in motor status 30 minutes after the start of the trial ($p < 0.0001$). In addition, in the apomorphine test both 2.5 and 4 mg / kg doses decreased the number of turns ($p < 0.001$). This suggests that OcTx-1202 may be acting to alleviate motor signals, but the assays did not demonstrate a significant neuroprotective effect.

Key words: Parkinson's disease, Animal's model, Peptides, wasp venom, 6-hydroxydopamine and neuroprotection.

Introdução

1. Introdução

1.1 Histórico da Doença de Parkinson

Intitulada inicialmente como “paralisia agitante”, a Doença de Parkinson (DP) foi primeiramente descrita por James Parkinson, um médico inglês que publicou os seus achados no ensaio denominado “An Essay on the Shaking Palsy” em 1817. Em seus estudos, Dr. Parkinson observou 6 pacientes do sexo masculino, com idades variando entre 50 e 72 anos, e caracterizou os principais sinais da doença. A primeira descrição dessa desordem veio como “movimentos involuntários tremulantes, com diminuição da força muscular, em partes sem ação e mesmo com auxílio; com tendência para a inclinação do tronco para frente e com alteração da marcha (festinação), tendo os sentidos e o intelecto não afetados” (para revisão TEIVE, 1998; JOST; REICHMANN, 2017).

Coube a Jean Martin-Charcot a denominação da Doença de Parkinson, em homenagem ao médico inglês, para a paralisia agitante. Além disso, as contribuições de Charcot vão além de apenas a denominação desta desordem. Ele é também responsável pela definição dos quatro sinais cardinais da doença, sendo eles: bradicinesia, rigidez, tremor em repouso e instabilidade postural e, dessa forma, estabeleceu um quadro clínico mais detalhado para a DP. Charcot também acrescentou critérios para o diagnóstico diferencial e sugeriu o primeiro tratamento para a doença (WALUSINSKI, 2018).

Somente no século 20, obteve-se progresso quanto ao estudo dos mecanismos neuropatológicos da DP. Fritz Lewy foi o responsável por identificar as inclusões intracelulares, nomeadas mais tarde como Corpos de Lewy pelo neurologista russo Konstantine Tretiakoff em sua homenagem (RODRIGUES E SILVA et al., 2010). Além disso, Tretiakoff também foi responsável por identificar a principal região afetada pela DP, sendo esta a *Substantia nigra* (SN) (LEES et al., 2008). Arvid Carlsson e colegas propuseram a perda de dopamina nos gânglios da base como razão do desenvolvimento da DP, confirmado subsequentemente por Oleh Hornykiewicz e outros (CARLSSON et al, 1957; BERTLER; ROSENGREN, 1959; EHRINGER; HORNYKIEWICZ, 1998).

1.2 Aspectos gerais da Doença de Parkinson

A DP é a segunda desordem neurodegenerativa mais prevalente, antecedida pela Doença de Alzheimer, caracterizada por ser crônica e progressiva e, até o presente momento, sem tratamento curativo definido. O envelhecimento é um dos fatores que está diretamente relacionado com o desenvolvimento da DP (RODRIGUEZ et al., 2015). Estima-se que a doença afete entre 1-2% da população acima de 60 anos, aumentando a sua incidência com o avanço da idade. Além de estudos apontarem para uma maior prevalência em homens que em mulheres (POEWE et al., 2017).

Assim como outras doenças neurodegenerativas relacionadas com a idade, a DP ainda apresenta etiologia desconhecida. Tanto fatores ambientais quanto genéticos mostraram estar relacionados com o seu desenvolvimento, o que leva a crer em um complexo de fatores responsáveis por desencadear o processo de neurodegeneração, como: neurotoxinas ambientais, estresse oxidativo, distúrbios mitocondriais, excitotoxicidade, desdobramento de proteínas e sua agregação e comprometimento das vias de liberação de proteínas e mecanismos autônomos das células, além de fatores genéticos e epigenéticos (MHYRE et al., 2012; MAITI; MANNA; DUNBAR, 2017; SCHAPIRA et al., 2017).

A DP pode ter origem tanto de forma esporádica quanto por mutações genéticas, sendo que essa última forma representa aproximadamente 10% de todos os casos da doença (KARIMI-MOGHADAM et al., 2018). As formas hereditárias da DP são classificadas como desordens monogênicas com herança Mendeliana e até então 18 mutações genéticas foram identificadas, incluindo: SNCA [α -sinucleína], LRRK2, PARK2 [parkin], PINK1, and PARK7 [DJ-1]. Estes genes possuem um papel importante na execução de diversos processos na célula e sua desregulação implica no desencadeamento de uma série de fatores potencialmente patológicos para os neurônios, causando a neurodegeneração (LEVERENZ et al., 2009). Com relação à forma esporádica da DP, evidências apontam para uma associação tanto entre mutações genéticas como com fatores ambientais, com os mesmos genes sendo afetados tanto nos casos de DP hereditária quanto nos casos esporádicos (DENG et al., 2018).

Além disso, a DP é classificada como a desordem motora mais comum. O diagnóstico principal é dado com a manifestação de problemas nas funções motoras, como rigidez, tremor e bradicinesia (MARSILI et al., 2018). No entanto, sinais não-motores também são presentes na doença e alguns deles muitas vezes antecedem o surgimento dos clássicos sinais motores (BERG et al., 2015). Os sinais não-motores da DP incluem comprometimento cognitivo, sintomas neuropsiquiátricos, disfunção autonômica e hiposmia (MARINUS et al., 2018; PRELL, 2018). Além de também apresentar disfunção sensorial, visoespacial e desordens do sono (POEWE et al., 2017).

Tendo em vista a complexidade associada à sintomatologia, etiologia e neuropatológica da DP, essa doença vem sendo reconhecida como uma desordem multissistêmica e multifacetada, afetando diversos circuitos além do dopaminérgico, como o serotoninérgico, noradrenérgico e colinérgico (AARSLAND et al., 2018). Dessa forma, estudos mais detalhados acerca da DP se fazem necessários, uma vez que contribuirão no desenvolvimento de novas terapias que sejam capazes de tratar esta desordem.

1.3 Neuropatologia da Doença de Parkinson

A DP apresenta dois principais fatores neuropatológicos: a) A perda seletiva de neurônios dopaminérgicos da região da *substantia nigra pars compacta* (SNpc), localizado no mesencéfalo e b) achados citoplasmáticos de inclusões neurais de corpo de Lewy, composto principalmente de agregados fibrilares de α -sinucleína (RIZEK et al., 2016).

A morte de neurônios dopaminérgicos da SNpc representa a causa fundamental para o desenvolvimento da sintomatologia da doença. A principal via afetada pela perda seletiva dessas células é a nigroestriatal, responsável pelo controle da atividade motora (POWERS et al., 2017). Dessa forma, a queda na liberação de dopamina na região do caudado e putamen do estriado é responsável pelo aparecimento dos principais sinais motores da doença (rigidez, instabilidade postural, tremor em repouso e bradicinesia) (MAGRINELLI et al., 2016). Estima-se ainda que estes sinais só sejam aparentes após perda de 60% dos neurônios dopaminérgicos da SN (GROSCH et al., 2016).

O aparecimento de corpos de Lewy também desempenha um papel importante na neurodegeneração e progressão da DP. Estas inclusões citoplasmáticas são compostas principalmente de agregados proteicos de α -sinucleína, uma proteína de 140 resíduos de aminoácidos encontrada na membrana de sinapses nervosas, mitocôndrias e núcleo (ABELIOVICH et al., 2000). Sua função fisiológica ainda não é bem elucidada, porém acredita-se que a α -sinucleína possa agir na plasticidade sináptica, no transporte vesicular e na liberação de neurotransmissores (DIKIY; ELIEZER, 2012; STEFANIS, 2012).

A atividade neurotóxica da α -sinucleína está relacionada com a formação de seus agregados proteicos. Os monômeros dessa proteína unem-se formando oligômeros e subsequentemente fibrilamentos insolúveis, que agem desencadeando efeitos tóxicos nas células e levando à neurodegeneração (KIM; LEE, 2008; MELKI, 2015). O acúmulo de agregados dessa proteína pode ter múltiplas causas, podendo ter relação com o aumento na produção de α -sinucleína ou pela desregulação das vias do proteassoma e lisossoma (GANGULY et al., 2017). Além disso, mutações em genes específicos também estão relacionadas com a formação de agregados fibrilares de α -sinucleína, como é o caso de algumas formas hereditárias da DP (ZENG et al., 2018).

Sugere-se ainda que a neurotoxicidade desencadeada pela α -sinucleína seja através de sua capacidade de interferir no transporte de proteínas, causando comprometimento do sistema de autofágico e da função mitocondrial dos neurônios (ZHANG et al., 2018). Os agregados de α -sinucleína também podem estar relacionados com o aumento da inflamação nas áreas afetadas pela DP, como alguns estudos apontam em modelos animais (MCCANN et al., 2016).

Além disso, estudos propõem para uma possível atividade priônica dos fibrilamentos de α -sinucleína. Esta hipótese sugere que esses agregados formados no interior dos neurônios, podem ser transmitidos para outras células por meio de vias intra-axoniais. Uma vez que estes fibrilamentos são espalhados para outras células, eles promovem a formação de novos agregados proteicos e desencadeiam uma série de processos neurotóxicos (ANGOT et al., 2010; BRUNDIN et al., 2010). Dessa forma, os mecanismos patológicos causados pelo acúmulo destas proteínas

conferem tanto atividade neurotóxica quanto de capacidade de propagação entre neurônios saudáveis.

1.4 Mecanismos de neurodegeneração sugeridos na Doença de Parkinson

Visto que a DP é considerada uma desordem idiopática e progressiva, é de vital importância a compreensão de seus prováveis mecanismos de neurodegeneração. Dessa forma, estudos implicam para uma correlação entre diversos mecanismos patológicos que integram o desenvolvimento desta desordem, como: neuroinflamação, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e a desregulação do sistema de degradação de proteínas.

1.4.1 Neuroinflamação

A resposta neuroinflamatória é um evento de fundamental importância para a manutenção das funções e controle da homeostase no cérebro humano. No entanto, a superativação da inflamação pode apresentar riscos contra os neurônios, podendo desencadear um processo de neurodegeneração. Nesse sentido, um dos fatores que mais descrevem a neuropatologia de desordens neurodegenerativas, em especial a DP, é a neuroinflamação crônica e o estímulo microglial (BLOCK; HONG, 2007; GLASS et al., 2010; WANG et al., 2015). Estudos clínicos e não-clínicos já demonstram uma correlação entre aumento da resposta imune com o desenvolvimento da DP (AMOR et al., 2014)

A inflamação no tecido nervoso promove a ativação da micróglia e astrócitos, células imunes residentes do cérebro responsável pela manutenção do tecido nervoso. Esse estímulo leva a liberação de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, além do aumento nas concentrações de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RANSOHOFF, 2016). Esses fatores são responsáveis por causarem efeitos neurotóxicos, além de contribuírem para o estabelecimento da resposta imune adaptativa pela ruptura na barreira hemato-encefálica (VIVEKANANTHAM et al., 2015)

Acredita-se que um dos fatores responsáveis pela ativação microglial seja a liberação de neuromelanina, um subproduto do catabolismo das catecolaminas, no

espaço extracelular pelos neurônios dopaminérgicos degenerados (HIRSCH; VYAS, 2012). Outro fator que pode estar relacionado com a exacerbação da resposta neuroinflamatória é a formação de agregados proteicos de α -sinucleína. Estudos *in vitro* realizados com a micróglia de ratos mostraram um aumento na ativação dessas células quando em contato tanto com agregados de α -sinucleína quanto com sua forma não agregada (ZHANG, 2005; GLASS et al., 2010; KIM et al., 2013; ROODVELDT et al., 2013)

Contudo, sugere-se que a neuroinflamação não seja o fator principal desencadeante da DP e que, ao invés disso, assista na sua progressão. Além disso, estudos apontam que a desregulação da resposta imune seja um evento presente durante o envelhecimento e que, de certa forma, isso contribua para a formação de um ambiente favorável para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (FERRUCCI et al., 2005; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ et al., 2012)

1.4.2 Disfunção mitocondrial

Assim como em outras doenças neurodegenerativas, a perda da função mitocondrial é um dos fatores característicos da DP (SUBRAMANIAM; CHESSELET, 2013; CONNOLLY et al., 2017). A principal função da mitocôndria é o metabolismo energético a partir da fosforilação oxidativa, produzindo o trifosfato de adenosina (ATP), sendo amplamente encontrada em tecidos com alta demanda energética, como o cérebro e os músculos (RANGO; BRESOLIN, 2018).

A mitocôndria também é considerada a principal fonte de produção de espécies reativas de oxigênio, o que a confere alta toxicidade, podendo estar ligada com a perda seletiva de neurônios dopaminérgicos na DP. Além disso, pacientes portadores da DP possuem redução da atividade do complexo 1 da mitocôndria, como evidenciado em tecidos isolados desses pacientes (SCHAPIRA, 2007; BOSE; BEAL, 2016).

Uma das principais evidências que contribuem para a correlação entre a disfunção mitocondrial e o desenvolvimento da DP é a neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), um inibidor do complexo I da mitocôndria. A exposição acidental ao MPTP por viciados em drogas nos anos 80 levou-os ao

desenvolvimento de um quadro irreversível de parkinsonismo (LANGSTON et al., 1983).

Além disso, o acúmulo de agregados proteicos de α -sinucleína está diretamente ligado com a perda da função mitocondrial. Um de seus mecanismos neurotóxicos está relacionado com a desregulação na atividade do complexo I, o que leva ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e, assim, contribuindo com a neurodegeneração. Além disso, muitos dos genes ligados à quadros de DP hereditária estão diretamente ou indiretamente associados com a perda da função mitocondrial, o que contribui para o melhor conhecimento sobre a patogênese molecular da DP (para revisão AMMAL KAIDERY; THOMAS, 2018).

1.4.3 Estresse oxidativo

Outro mecanismo patológico responsável pela neurodegeneração envolvida na DP é o estresse oxidativo. A desregulação da manutenção fisiológica do potencial redox nos neurônios desencadeia uma série de eventos tóxicos para a célula, interferindo em seus processos biológicos e, conseqüentemente, levando à morte celular (VERA DIAS, EUNSUNG JUNN, 2014).

O aumento na produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio nos neurônios está diretamente relacionado com outros mecanismos patológicos da DP, como a disfunção mitocondrial e a neuroinflamação (POEWE et al., 2017). Cérebros *post mortem* de pacientes mostram marcadores de dano oxidativo e metais de transição, como o ferro, especialmente na região da SN (SOFIC et al., 1988; JENNER; OLANOW, 1996).

Além disso, o aumento no metabolismo de dopamina, acúmulo de ferro, peroxidação lipídica e o processo de envelhecimento também estão relacionados com o aumento de espécies reativas do oxigênio e, assim, contribuindo para a neurodegeneração na DP (MANOHARAN et al., 2016). O acúmulo de agregados proteicos de α -sinucleína também representa um papel patológico central no desencadeamento de estresse oxidativo (GANGULY et al., 2017). No entanto, ainda não está claramente evidenciado se o estresse oxidativo é o evento desencadeante da neurodegeneração ou apenas consequência de outro mecanismo patológico.

1.4.4 Excitotoxicidade Glutamatérgica

O sistema glutamatérgico é composto pelo neurotransmissor glutamato (L-glutamato) e receptores ionotrópicos (iGluRs): Cainato (KA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA) e N-metil-D-aspartato (NMDA), associados a canais catiônicos seletivos; e os receptores metabotrópicos (mGluRs 1-8) acoplados à proteína G, que desempenham mecanismos de respostas intracelulares (MARTÍNEZ-LOZADA; ORTEGA, 2015). O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e é amplamente distribuído pelo encéfalo (REINER; ISACOFF, 2014).

A manutenção do sistema glutamatérgico é de suma importância para preservação da homeostase e função cerebral normal, uma vez que o desequilíbrio dessa via desencadeia uma série de processos danosos ao SNC (ARUNDINE; TYMIANSKI, 2003; KEW, 2004). Além disso, alterações nesse sistema podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento e progressão de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson e Doença de Alzheimer (MEHTA et al., 2013). Desse modo, sugere-se que os receptores ionotrópicos (iGluRs) do tipo NMDA e os receptores (mGluRs) do grupo I são os responsáveis por desencadear a excitotoxicidade mediada por glutamato (ARUNDINE; TYMIANSKI, 2003; KEW, 2004).

De fato, os receptores de NMDA parecem desempenhar um papel importante na neuropatologia de doenças neurodegenerativas, visto que esses receptores são bastante permeáveis ao Ca^{2+} . Dessa forma, o aumento na concentração de cálcio intracelular pela superativação dos receptores de NMDA culmina numa série de eventos danosos para os neurônios, como ativação da síntese de óxido nítrico, a geração de radicais livres, apoptose e disfunção mitocondrial (CHEN et al., 2000; MARK et al., 2001; LEE et al., 2009; MEHTA et al., 2013).

Além disso, o aumento do influxo de cálcio também é responsável pela ativação de enzimas cinase-c e enzimas reguladas pela calmodulina (calpaínas e fosfolipases). Essas proteínas desencadeiam uma série de eventos destrutivos para os neurônios como o rompimento da membrana celular e, conseqüentemente,

ativação da neuroinflamação, assim como na degradação de proteínas neuronais estruturais (LIPTON; ROSENBERG, 1994; SCHWAB; MCGEER, 2008).

1.4.5 Comprometimento do sistema de autofagia

O processo de autofagia é um mecanismo celular que tem como função primordial a verificação da viabilidade das células. A autofagia ocorre pelo direcionamento de moléculas intracelulares danificadas ou desnecessárias para a célula para o lisossomo, onde ocorre a degradação e reciclagem. São três os principais mecanismos que compõem este processo, a) macroautofagia, b) microautofagia e c) autofagia mediada por chaperonas, que se diferem pela via a qual entregam as moléculas para o lisossomo (MOORS et al., 2016; PLAZA-ZABALA et al., 2017). Dessa forma, no encéfalo, o comprometimento do sistema de autofagia representa um dos mecanismos patológicos principais de doenças neurodegenerativas, em especial a DP. O acúmulo indiscriminado de agregados proteicos, em especial da α -sinucleína, está intimamente ligado com a alteração deste sistema, levando, assim, ao desencadeamento de uma série de fatores responsáveis pela neurodegeneração (GHAVAMI et al., 2014).

Além disso, formas hereditárias da DP que estão ligadas à mutações nos genes PINK1 e PARK estão associadas com o comprometimento do sistema de autofagia. Estas proteínas apresentam papel essencial na via de transporte das moléculas marcadas para o lisossomo (WHITWORTH; PALLANCK, 2017).

Tendo em vista estes fatores, a desregulação do mecanismo de autofagia pode estar relacionada diretamente com o início e progressão da DP, tendo impacto na formação da α -sinucleína e, por consequência, na perda de neurônios dopaminérgicos da SNpc e comprometimento da função motora.

1.5 Modelos animais da Doença de Parkinson

Tendo em vista que a DP representa uma desordem complexa, sem uma causa ainda definida e podendo apresentar perfil de quadro tanto esporádico quanto familiar, uma melhor compreensão em relação aos mecanismos moleculares da DP torna-se necessária, considerando-se o aumento na incidência e baixa disponibilidade de tratamentos eficazes.

Dessa forma, modelos animais da DP apresentam importância significativa nos estudos acerca desta desordem, uma vez que contribuem no desenvolvimento de tratamentos mais eficazes, além de proporcionar estudos mais detalhados com relação aos aspectos da doença. Estes modelos visam mimetizar as características patológicas e fenotípicas gerais da DP a partir da administração sistêmica ou local de neurotoxinas específicas para neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal em mamíferos (primatas ou roedores) (BLANDINI; ARMENTERO, 2012). No entanto, os atuais modelos experimentais *in vivo* não representam o quadro complexo da DP, e, por isso, são mais encaixados como causadores de um quadro de Parkinsonismo, desordem similar que replica os aspectos gerais da doença.

O MPTP é considerado um dos modelos mais clássicos da DP, pois possui capacidade de atravessar a BHE, podendo ser administrada de forma sistêmica, e apresenta toxicidade seletiva para neurônios dopaminérgicos da SN. Uma vez no cérebro, o MPTP é transformado no íon 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP⁺) pela enzima monoamino oxidase B (MAOB), que confere a toxicidade a essa molécula. Em seguida, o MPP⁺ é transportado para o interior de neurônios dopaminérgicos, onde age inibindo o complexo I da mitocôndria e desencadeando uma série de processos que levam ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, à morte neuronal (para revisão ver JACKSON-LEWIS et al., 2012). Este modelo experimental é de grande relevância, uma vez que além de representar o fenótipo motor característico da DP, também teve grandes implicações no envolvimento da disfunção mitocondrial com a doença.

Outro modelo animal de DP também muito utilizado resulta da administração de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), um análogo hidroxilado da dopamina. Seu mecanismo patológico está ligado ao aumento de espécies reativas do oxigênio no neurônio, além de também inibir o complexo I da mitocôndria mitocondrial. Porém, diferente do MPTP, a 6-OHDA não possui capacidade de atravessar a BHE e, por isso, tem que ser administrado diretamente na SNpc ou no estriado. Após a injeção local dessa neurotoxina, a 6-OHDA é transportada para o interior dos neurônios pelos transportadores de dopamina (DAT), onde é auto-oxidada levando ao estresse oxidativo e a morte celular (SHIMOHAMA et al., 2003). Geralmente, o modelo de 6-

OHDA é usado para lesão unilateral, causando um quadro de hemiparkinsonismo no animal.

Uma das principais vantagens com relação ao uso da 6-OHDA é o fato dessa toxina causar eliminação previsível de neurônios dopaminérgicos, cerca de 60% de neurônios contendo tirosina hidroxilase (TH) de rato ou camundongo (BLANDINI et al, 2008). Além de também fornecer um fenótipo comportamental similar ao da DP.

Porém, tanto o modelo de 6-OHDA quanto o de MPTP, por gerarem quadros de parkinsonismo, não são capazes de simular a DP. Uma vez que não são capazes de replicar a formação de agregados intracelulares de α -sinucleína, um dos principais fatores neuropatológicos da DP.

Em contrapartida, a rotenona, um herbicida/inseticida altamente lipofílico também usado para modelos animais de DP, consegue replicar quase todas as características patológicas da doença, incluindo alteração comportamental, agregados fibrilares de α -sinucleína, alteração comportamental, inflamação inibição do complexo 1 da mitocôndria, estresse oxidativo e problemas gastrointestinais (GREENAMYRE et al., 2010). Porém, a desvantagem no uso desse modelo é devido à sua inconsistência em reproduzir quadros de parkinsonismo satisfatórios nos animais. Além de apresentar alta toxicidade para outros órgãos e alguns estudos mostrarem que a rotenona pode causar degeneração em outras populações de neurônios, podendo levar a outros padrões de doenças e, assim, dificultar o desenvolvimento de um tratamento neuroprotetor confiável (para revisão BLANDINI; ARMENTERO, 2012).

Outros modelos de DP também muito utilizados na realização de experimentos são os genéticos, que buscam reproduzir condições patológicas similares às desenvolvidas por quadros hereditários da DP (LE et al., 2014). A importância desses modelos advém da possibilidade de identificação de alvos terapêuticos para tratar a doença, uma vez que as mutações sobre esses genes desempenham um papel importante na neuropatologia da DP. Porém, muitos dos modelos genéticos realizados em roedores não replicaram a neurodegeneração nigroestriatal presente na DP, possivelmente devido aos animais apresentarem

outros mecanismos compensatórios que prevejam o surgimento do parkinsonismo (para revisão ver JACKSON-LEWIS; BLESA; PRZEDBORSKI, 2012).

Dessa forma, tanto os modelos animais de DP de toxinas quanto os genéticos apresentam grande relevância nos estudos sobre essa desordem e contribuem no desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas. Assim, o uso das toxinas fornece uma melhor visão sobre a degeneração nigroestriatal, além de replicar de forma consistente as características sintomatológicas da DP, enquanto os modelos genéticos proporcionam uma compreensão melhor acerca dos mecanismos moleculares da DP, principalmente para os casos hereditários da doença.

1.6 Tratamento farmacológico para a Doença de Parkinson

Como relatado anteriormente, a principal característica neuropatológica da DP é a perda seletiva de neurônios dopaminérgicos da SNpc, levando a uma queda na produção de dopamina e, conseqüentemente, comprometendo a via nigroestriatal (POWERS et al., 2017). Dessa forma, os principais fármacos desenvolvidos até hoje para a DP se baseiam na tentativa de restabelecer a neurotransmissão dopaminérgica na região, na tentativa de aliviar os sinais da doença.

O primeiro fármaco desenvolvido para o tratamento da DP foi a Levodopa (L-DOPA), um precursor da dopamina capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) (BIRKMAYER; HORNYKIEWICZ, 1962). Até hoje, a L-DOPA ainda é considerada a primeira linha de tratamento da DP. O principal objetivo desse fármaco é o alívio sintomático motor, uma vez que age aumentando os níveis de dopamina nos neurônios remanescentes ou aumentando o fluxo de dopamina nas sinapses da via nigroestriatal.

A L-DOPA deve ser administrada junto com a carbidopa ou benserazida, fármacos inibidores da monoamino oxidase B (MAO-B). Esta associação farmacológica confere uma diminuição nos efeitos adversos periféricos, além de aumentar o tempo de meia vida da L-DOPA, impedindo que ela seja degradada na parede do intestino delgado (RAY CHAUDHURI et al., 2016). Tanto a carbidopa quanto a benserazida não possuem a capacidade de atravessar a BHE e, por isso, agem exclusivamente nos órgãos periféricos (AQUILONIUS; NYHOLM, 2017).

No entanto, o uso prolongado da L-DOPA, em pacientes com quadros avançados da DP, pode levar ao desenvolvimento de efeitos adversos severos, como a discinesia e flutuações motoras (DEVOS et al., 2013). Estes efeitos estão geralmente associados com o aumento da concentração de dopamina e da própria levodopa no tecido nervoso, e afeta de forma negativa a qualidade de vida do paciente (CALABRESI et al., 2010).

Outras classes de fármacos também são usados como alternativas no tratamento da DP, como os agonistas dopaminérgicos (apomorfina e bromocriptina), inibidores da MAO-B (selegilina and rasagilina), inibidores da catecol-O-metiltransferase periférica (COMT) (entacapona e tolcapona) inibidores da acetilcolinesterase (AChE) (galantamina) (SZETO; LEWIS, 2016); antagonistas glutamatérgicos dos receptores NMDA (amantadina) (GONZALEZ et al., 2015); fármacos anticolinérgicos (benzatropina e triexifenidil) (PEREZ-LLORET et al., 2016), e mais recentemente um pró-fármaco norepinefrina chamado Droxidopa (HAUSER et al., 2016). Porém, estes medicamentos também são usados apenas para o alívio sintomático e não impedem o avanço da DP.

1.7 A peçonha de vespas

Venenos e peçonhas de animais são o resultado de milhões de anos de pressão evolutiva, que levaram ao desenvolvimento de moléculas com alta especificidade e afinidade a receptores moleculares com grande potencial farmacológico. O repertório extraordinariamente diverso dessas secreções de animais evoluiu como uma ferramenta de predação e defesa e, por isso, são frequentemente associados à atividade no sistema nervoso e cardiovascular, com a capacidade de interferir em uma série de processos fisiológicos e bioquímicos vitais (FRY et al., 2009). Tal efeito neurológico disruptivo pode ser atribuído à sua capacidade de modular sinapses, agindo com notável potência e seletividade em vários alvos biológicos, incluindo receptores, canais iônicos e enzimas.

As neurotoxinas também são amplamente encontradas nas peçonhas de vespas (MORTARI et al., 2007b) e sua atividade está relacionada com a interferência na atividade sináptica de células do SNC, podendo alterar atividades excitatórias ou inibitórias de neurônios. Geralmente, essas moléculas são pertencentes à classe dos peptídeos ou das acilpoliaminas, podendo atuar como

agonista ou antagonista de receptores ionotrópicos ou metabotrópicos, como os glutamatérgicos (BELEBONI et al., 2004; MELLOR; USHERWOOD, 2004; PIMENTA; DE LIMA, 2005; MORTARI et al., 2007b). Dessa forma, esses compostos demonstram alta especificidade e afinidade para substratos neurais, o que possibilita um alto potencial como fármaco modelo e para o seu uso como tratamento de desordens neurológicas (SCHWARTZ et al., 2012)

Nesse sentido, o uso de peçonhas de animais representa uma alternativa promissora no tratamento de doenças neurodegenerativas, em especial a DP. Visto que muitas dessas desordens não apresentam um tratamento que melhore significativamente o seu quadro fisiopatológico, sendo utilizados comumente fármacos destinados apenas para o alívio sintomático. Tal é o caso do peptídeo Occidentalina-1202 (OcTx-1202), uma molécula bioativa constituída por 9 resíduos de aminoácidos e sequência similar ao peptídeo natural isolada da peçonha da vespa *Polybia occidentalis*. Em estudos anteriores, a OcTx-1202 demonstrou um potente efeito anticonvulsivante dose-dependente contra crises induzidas por ácido caínico (CARNEIRO, 2013). Dessa forma, o peptídeo possivelmente age desenvolvendo uma proteção contra a excitação excessiva dos neurônios, de forma a impedir a morte celular e, por conseguinte, pode ser uma nova e promissora alternativa farmacológica para a DP.

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo a avaliação do efeito neuroprotetor da OcTx-1202, através da sua administração por via subcutânea (s.c) em um modelo murino de Parkinsonismo induzido por 6-OHDA. O composto peptídico apresenta a capacidade de atravessar a BHE (CARNEIRO, 2013), o que lhe atribui a vantagem pela facilidade na forma de administração.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliação do efeito neuroprotetor do peptídeo OcTx-1202 por administração via subcutânea, após indução de um quadro de Parkinsonismo pela neurotoxina 6-OHDA em um modelo murino.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliação do efeito do peptídeo OcTx-1202 no desempenho motor de camundongos após lesão intraestriatal por 6-OHDA.
- Avaliação da atividade neuroprotetora da OcTx-1202 no teste de rotação contralateral após desafio com Apomorfina.
- Avaliação do efeito neuroprotetor do peptídeo atrelado à quantificação de neurônios dopaminérgicos marcados com imunofluorescência.

Material e métodos

3. Material e métodos

O peptídeo Occidentalina-1202 (OcTx-1202; sequência: Glu-Gln-Tyr-Met-Val-Ala-Phe-Trp-Met-NH₂) (Mortari, 2007) foi sintetizado pela empresa Biointech[®] com sequência igual ao natural. As doses da OcTx-1202 foram administradas por via subcutânea em camundongos (*Mus musculus*) machos Swiss com idade de 5 a 7 semanas e com peso variando entre 20 a 35 g, em 3 administrações consecutivas: 1h, 72h e 120h após o insulto com a 6-OHDA. Os animais foram adquiridos do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília e mantidos em condições controladas de luz (ciclo de 12 horas claro e escuro) e temperatura (23 °C), recebendo água e ração *ad libitum*. A manipulação dos animais seguiu os Princípios Éticos na Experimentação Animal – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 1991), seguindo a lei AROUCA 11794. Além disso, o presente projeto foi submetido e aprovado pelo CEUA-UnB protocolo UnBDoc nº 79100/2014 (Anexo 1).

3.1 Determinação dos grupos experimentais

Os animais foram separados em três grupos diferentes para a execução dos experimentos. O grupo controle negativo, chamado de grupo 6-OHDA, em que os animais receberam a infusão de 6-OHDA (40 µg/animal, solubilizada em solução veículo: água e ácido ascórbico 0,2%) via intraestriatal e foram tratados com 100 µL da solução PBS com 20% DMSO por via subcutânea. O grupo sadio, que recebeu a solução veículo (água e ácido ascórbico 0,2%) via intraestriatal, ao invés da 6-OHDA, e foram tratados com 100 µL da solução PBS 20% DMSO por via subcutânea. O grupo tratado com o peptídeo Occidentalina-1202, chamado de Grupo OcTx-1202, que recebeu a infusão da 6-OHDA (40 µg/animal, solubilizada em veículo: água e ácido ascórbico 0,2%) e foram tratados com o composto peptídico nas doses de 1, 2,5 e 4 mg/kg de animal por via subcutânea (s.c).

3.2 Procedimento cirúrgico para indução do hemiparkinsonismo em modelo murino de 6-OHDA

Para a elucidação do efeito antiparkinsoniano da OcTx-1202 *in vivo*, um procedimento neurocirúrgico foi estabelecido a fim de induzir o parkinsonismo nos camundongos a partir da infusão intraestriatal da neurotoxina 6-OHDA, conforme a descrição a seguir (ALVAREZ-FISCHER et al., 2008; DA CONCEIÇÃO et al., 2010).

Os camundongos foram primeiramente anestesiados com uma injeção intraperitoneal de cloridrato de Ketamina (Dopalen, Ceva®, 75 mg/kg, intraperitoneal – i.p.) e Xilazina (Anasedan, Ceva®, 15 mg/kg, i.p.) e após a verificação da sua insensibilidade a estímulos nociceptivos, os animais foram colocados em um aparelho estereotáxico para o início do procedimento cirúrgico. Após a fixação do animal no estereotáxico, foi realizada a assepsia e tricotomia, com o auxílio de uma tesoura, administrou-se o cloridrato de lidocaína com hemitartrato de norepinefrina (Lidostesim, Densply®, subcutâneo - sc), um anestésico local com vasoconstrictor, e, então, a pele foi removida para a exposição do crânio (Figura 1-A). Em seguida, foram realizadas as medidas estereotáxicas necessárias para o correto posicionamento da agulha de injeção da 6-OHDA na região do estriado esquerdo, de acordo com as seguintes coordenadas estereotáxicas em relação ao ponto do Bregma: 0 mm (antero-posterior), + 2,5 mm (meso-lateral) e – 3,5 mm (dorso-ventral) (PAXINOS; FRANKLIN, 2004). Após a marcação do lugar de injeção, foi realizada uma perfuração na região com o uso de uma broca (Dremel®), por onde os camundongos receberam uma injeção de 4 µl de 6-OHDA (Sigma, Brasil, 40µg/animal da base livre) ou veículo (água e ácido ascórbico 0,2%) diretamente na região do estriado (Figura 1-B). Nessa etapa, foi utilizado um sistema de infusão, formado por um tubo de polietileno acoplado a uma seringa de precisão (Hamilton®) de 10 µl e uma bomba de infusão (Insight, Brasil), com uma taxa de injeção de 0,5 µl/min. Ao término do procedimento, a região de exposição do crânio do animal foi revestida com o acrílico dental autopolimerizante para proteção e os camundongos foram mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob as condições anteriormente relatadas. Após a recuperação da anestesia e durante todo o protocolo experimental, os animais receberam soro glicosado 5% (Equipex®), por via s.c. e água e ração pastosa por via oral a fim de garantir a sobrevivência dos mais enfraquecidos pelo procedimento cirúrgico.

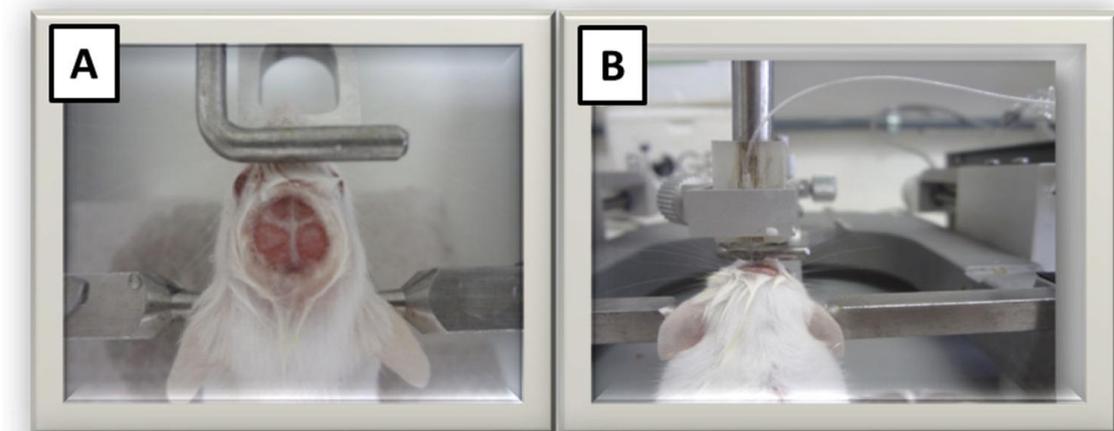


Figura 1: Procedimento neurocirúrgico. Em A: exposição do crânio e da linha do bregma. B: Lesão estriatal dopaminérgica com infusão de 40 $\mu\text{g}/4\mu\text{l}$ de 6-OHDA diretamente no estriado esquerdo utilizando uma bomba de infusão com um fio de polietileno acoplado a uma seringa Hamilton de 10 μl (Biolchi, 2018).

3.3 Administração das doses do peptídeo OcTx-1202

O peptídeo Occidentalina-1202 ou veículo foram administrados por via s.c. nas doses de 4, 2,5 e 1 mg/kg. A primeira dose foi administrada 1h (1^o dia), a segunda 72h (3^o dia) e a terceira 120 h (5^o dia) após o insulto com a 6-OHDA. Vale ressaltar que a administração do peptídeo deu-se sempre no mesmo horário (Figura 2).

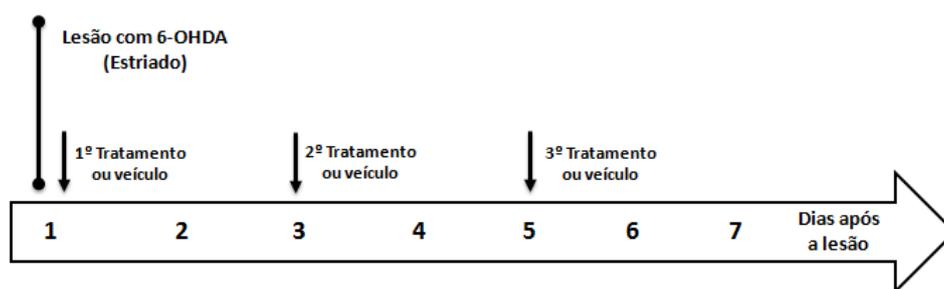


Figura 2: Esquema ilustrativo do delineamento experimental utilizado para a administração dos peptídeos ou veículo em estudo. No primeiro dia, os animais receberam uma injeção intraestriatal de 40 $\mu\text{g}/4\mu\text{l}$ de 6-OHDA. Os compostos foram administrados por via s.c. 1h, 72h e 120 h após a infusão de 6-OHDA (Biolchi, 2018).

3.4 Ensaios comportamentais

Com a finalidade de avaliar a coordenação motora dos animais, a habilidade de se manterem em uma barra giratória foi testada, a partir da quantificação do tempo de permanência de cada camundongo no aparelho Rotarod (Insight, Brasil). Esse aparelho consiste de uma barra metálica cilíndrica giratória de 5 cm de diâmetro com rotação constante de 20 rotações por minuto.

Um dia antes do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos a um treino de corrida de 300 segundos no Rotarod, 5 vezes e com média de descanso de 5 minutos entre as corridas. No dia seguinte, os animais foram novamente colocados no aparelho e os que conseguiram permanecer por mais de 300 segundos foram selecionados para o procedimento cirúrgico. Os camundongos que não conseguiram permanecer no Rotarod por um mínimo de 300 segundos foram descartados do experimento.

3.4.1 Avaliação do desempenho motor no aparelho Rotarod

Este teste consiste na avaliação do desempenho da coordenação motora em um aparelho de rotação Rotarod. No quinto dia após a lesão foi realizado o teste de coordenação motora ao longo de 6 horas, nos seguintes tempos: 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300 e 360 minutos no aparelho Rotarod, com o objetivo de quantificar o tempo de permanência na barra giratória pelos camundongos (Figura 3)

3.4.2 Ensaio de comportamento rotatório após desafio de apomorfina

Neste teste, os animais receberam uma injeção subcutânea do agonista dopaminérgico apomorfina (5 µg/animal - Sigma). Após a injeção, os animais foram colocados em uma arena de 30 cm de diâmetro para a habituação durante 5 minutos e filmados por mais 15 minutos por uma câmara acoplada a um computador. Este teste tem como finalidade a verificação do número de rotações contralaterais e ipsilaterais exibidas pelo animal e determinação do seu grau da lesão. O experimento foi realizado no 7º dia após a lesão por 6-OHDA (Figura 3).

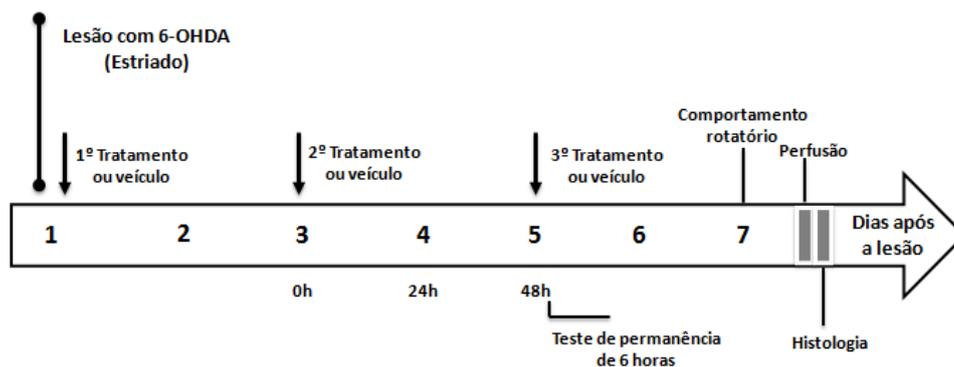


Figura 3. Esquema geral ilustrativo do delineamento experimental. A administração dos peptídeos ou veículo em estudo e os ensaios comportamentais foram realizados durante os sete dias de experimento. No primeiro dia, os animais receberam uma injeção intraestriatal de 6-OHDA (40 ug/4 µl). O teste de permanência por 6 horas ocorreu no quinto dia após a lesão. No sétimo dia, foi realizado o teste de comportamento rotatório após desafio com a apomorfina seguindo para a histologia (Biolchi, 2018).

3.5 Perfusão e histologia

Após a administração dos compostos e da avaliação comportamental, os animais foram eutanasiados por via *i.p.* (intraperitoneal) com tiopental sódico (1g) e em seguida perfundidos por via transcardíaca inicialmente com 50 ml de solução salina a 0,9% seguida de 50 ml de solução de uma solução fixadora de formaldeído a 4% por 24 horas. Após este período, os cérebros foram colocados em solução de sacarose a 30% (tampão fosfato 0,1M, pH 7,4) por 48 horas e em seguida foram seccionados horizontalmente, cada corte com 30 µm de espessura utilizando-se um vibrátomo (KD-400 Vibration Microtome, Zhejiang Jinhua Kedi Instrumental). Os cortes coronais seriados foram selecionados de acordo com o atlas (PAXINOS; FRANKLIN, 2004). Após a identificação, os cortes foram colhidos sequencialmente em compartimentos e colocados em solução *anti-freezing* para a realização do teste de imunofluorescência.

3.6 Detecções pela técnica de imunohistoquímica

3.6.1 Avaliação da viabilidade de neurônios reativos a tirosina hidroxilase

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

Os cortes foram lavados em solução tampão salina-fosfato (PBS), duas vezes por 10 minutos e permeabilizados na mesma solução com 0,8% Triton X-100 por 1 hora. Em seguida, foram realizadas três lavagens com tampão salina-fosfato e os cortes foram colocados em uma solução bloqueadora “Protein Block” (1% BSA, 10% leite desnatado, 0,3 M de glicina, 0,1% Tween 20) por 1 hora. Posteriormente, as fatias foram incubadas com o anticorpo primário a 4 °C, sob agitação constante por 48 horas.

Após a incubação, os cortes foram novamente lavados com solução tampão salina-fosfato e incubados novamente, porém agora com o anticorpo secundário, na concentração de 1:400 diluído em tampão salina-fosfato + 1% BSA a temperatura ambiente e sobre agitação constante por 3 horas no escuro. Por último, foram feitas três lavagens de 4 minutos cada no escuro e as lâminas foram montadas com o Fluorescente Média 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (20 ml) (Abcam[®], EUA). Para a montagem das lâminas, uma gota do DAPI foi colocada em cima de cada corte e deixado a temperatura ambiente por 5 minutos, antes de colocar as lamínulas e vedar com esmalte incolor.

3.6.2 Análise por microscopia de epifluorescência

Os cortes obtidos pelo método de dupla marcação foram analisados utilizando-se um microscópio epifluorescente (Leica DM 2000, Alemanha). As fotomicrografias foram documentadas no aumento de 20X. O local analisado corresponde à região da SN, dividido em citoplasma celular reativo a TH que

apresentaram a emissão de coloração em verde e os núcleos que apresentam a coloração em azul (LI; ZHOU, 2013) (Figura 4).

Para a quantificação da lesão foi utilizada a contagem dos neurônios reativos a TH na região da SN. Para esta contagem, foram usadas de 2-3 fatias cerebrais de cada grupo. Foram considerados como neurônios viáveis aqueles que continham seus citoplasmas e núcleos que emitiam a fluorescência (Figura 4). Os resultados foram analisados na proporção de neurônios presentes na região lesada em relação ao lado sadio do corte.

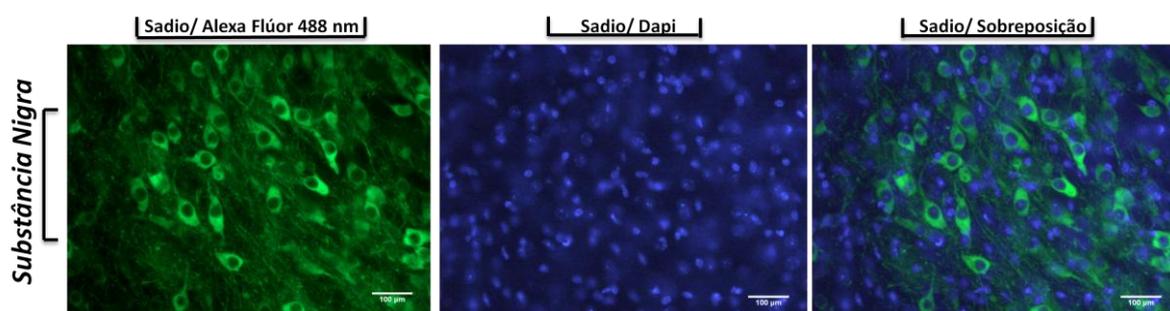


Figura 4 (Biolchi, 2018): Imagem demonstrativa para quantificação de neurônios reativos a TH na região da SN. Consideraram-se os neurônios que continham os citoplasmas que emitiam a fluorescência em verde (Sadio/Alexa flúor-488) e os núcleos marcados a partir de um meio de montagem Fluorescente Média com DAPI (Sadio/DAPI). Dupla marcação dos neurônios com citoplasmas em verde e núcleos em azul (Sadio/ Sobreposição).

3.7 Análise estatística

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

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

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

Resultados

4. Resultados

4.1 Avaliação do desempenho motor no aparelho Rotarod

No quinto dia após a lesão induzida pela 6-OHDA, os animais foram submetidos a um teste de avaliação de coordenação motora, que consiste na análise de permanência no aparelho Rotarod em 13 tempos distintos ao longo de 6 horas. O teste inicia-se 30 minutos após a terceira administração do peptídeo e os seguintes intervalos de tempo são analisados: 0, 15, 30, 45, 90, 120, 150, 180, 210, 300, 360 min. O tempo máximo de permanência dos animais no aparelho é de 300 segundos e o tempo mínimo é de 1 segundo.

Os resultados mostraram que houve diferença significativa entre os grupos [Two-way ANOVA: $F_{(4,30)} = 13,04$; $p < 0,0001$] seguido do pós-teste Bonferroni. Com relação às doses da Occidentalina-1202, não houve diferença significativa entre as menores doses testadas (1 e 2,5 mg/kg) com o grupo 6-OHDA + veículo, mas o grupo 6-OHDA manteve-se significativamente por menos tempo no equipamento quando comparado ao grupo sadio. A dose de 4 mg/kg também não demonstrou diferença significativa com relação ao grupo 6-OHDA + veículo, porém, os animais mostraram melhora na coordenação motora 30 minutos após o início do teste (Figura 5).

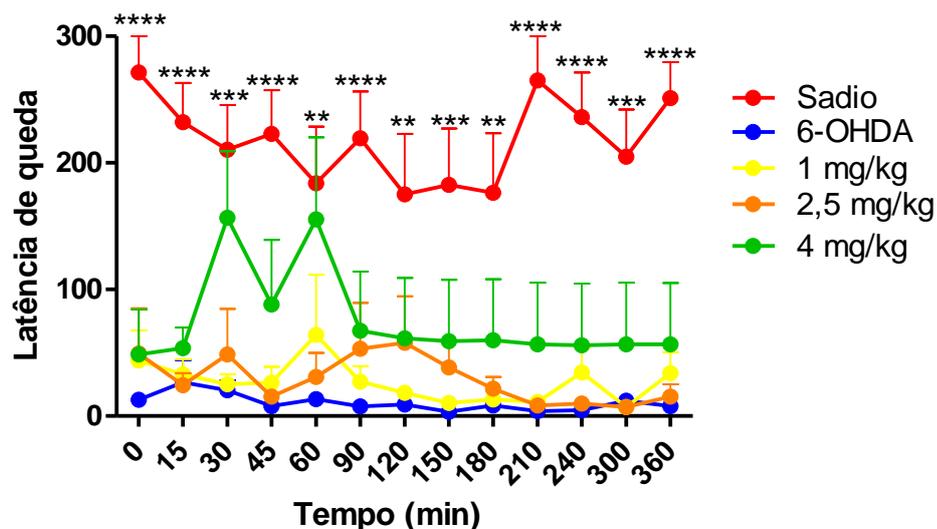


Figura 5: Efeito dos tratamentos no teste de permanência 6 horas. Tempo em segundos que os animais permaneceram no Rotarod para 13 avaliações diferentes após a lesão. Grupos controles: 6- OHDA+ veículo (6-OHDA, n= 6) e grupo Sadio (Sadio, n = 8). Grupo OcTx-1202 (1 mg/kg (n=6), 2,5 mg/kg (n=8), 4mg/kg (n=6) Tratamentos com diferenças significativas **** (p < 0,0001) em relação ao grupo controle 6-OHDA (Two-way ANOVA: [F_(4,30) = 13,04; p<0,0001]).

4.2 Avaliação do comportamento rotatório após desafio com apomorfina

No sétimo dia após a indução de parkinsonismo nos animais, foi realizado o teste de indução de comportamento rotatório após desafio com apomorfina. Esse ensaio consiste na contagem de giros ipsilaterais e contralaterais dos animais após a injeção subcutânea do agonista dopaminérgico apomorfina. Os animais do grupo sadio não apresentam comportamento rotatório, enquanto os animais do grupo 6-OHDA + veículo apresentam uma quantidade elevada de giros.

Neste ensaio, os resultados mostraram que houve diferença significativa entre o grupo sadio e 6-OHDA + veículo [One-way ANOVA: [F_(4,30) = 9,254; p<0,0001], com relação ao número de giros dos animais. Os animais tratados com a Occidentalina-1202 na dose de 1 mg/kg apresentaram menos giros quando comparados com o grupo 6-OHDA + veículo, porém essa diferença não foi significativa. O pós-teste demonstrou que o peptídeo na dose de 2,5 mg/kg

apresentou menor número de rotações sendo significativamente diferente do grupo 6-OHDA + veículo ($p < 0,0001$). O grupo tratado com a OcTx-1202 na dose de 4 mg/kg também mostrou uma quantidade de giros menor que o grupo 6-OHDA + veículo, sendo significativamente diferente ($p < 0,001$) (Figura 6).

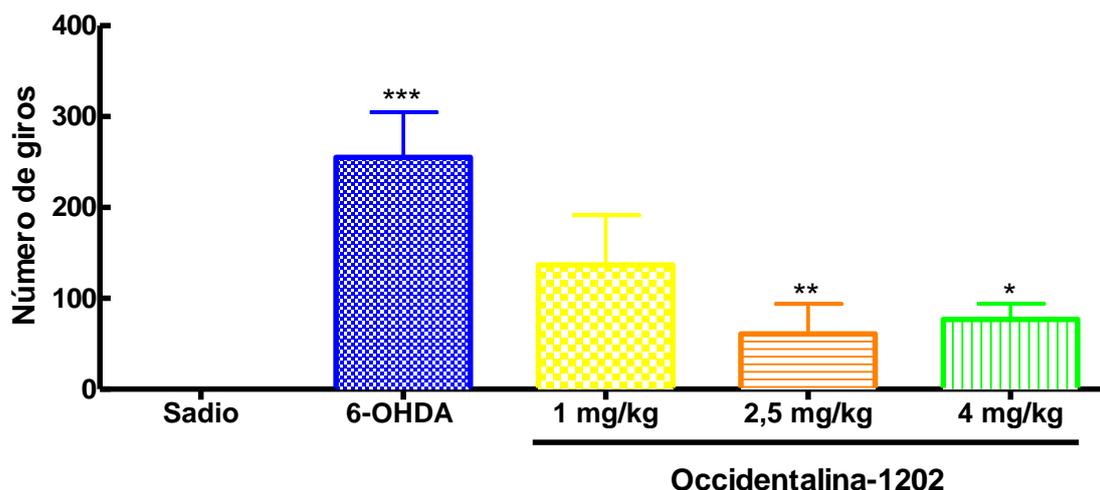


Figura 6: Comportamento rotatório após desafio com apomorfina (agonista dopaminérgico) injetado por via s.c. (5 ug/animal) em camundongos previamente injuriados com 6-OHDA. Grupos controles: 6-OHDA+ veículo (6-OHDA, n= 8) e Sadio (Sadio, n = 6). Grupo OcTx-1202 (1 mg/kg (n=6), 2,5 mg/kg (n=8), 4 mg/kg (n=7) Grupos com diferenças significativas ** ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle 6-OHDA + Veículo (One-way ANOVA: [$F_{(4,30)} = 9,254$; $p < 0,0001$]).

4.3 Avaliação dos neurônios dopaminérgicos viáveis na região da Substância negra

A análise de neurônios dopaminérgicos viáveis da região da SN foi realizada seguindo a proporção de neurônios preservados no lado lesionado (esquerdo) em relação ao lado sadio (direito), considerando-o como 100%. A técnica utilizada neste ensaio foi a de imunofluorescência, que se baseia na imunomarcagem da enzima tirosina hidroxilase (TH), presente em neurônios dopaminérgicos. As células marcadas emitem uma coloração citoplasmática esverdeada, indicando o corpo celular, e uma coloração nuclear azulada.

No teste One-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey, observou-se uma diferença significativa entre as porcentagens de neurônios dos grupos 6-OHDA + veículo e sadio [$F_{(4,29)}=4,606$; $p=0,0053$]. As três doses usadas no tratamento foram capazes de preservar a proporção de neurônios, porém os valores não apresentaram diferença significativa com relação ao grupo 6-OHDA + veículo. Além disso, as doses de 1, 2,5 e 4 mg/kg apresentaram uma porcentagem relativa de neurônios similares e também não obtiveram diferença significativa com relação ao grupo sadio (Figura 7-10).

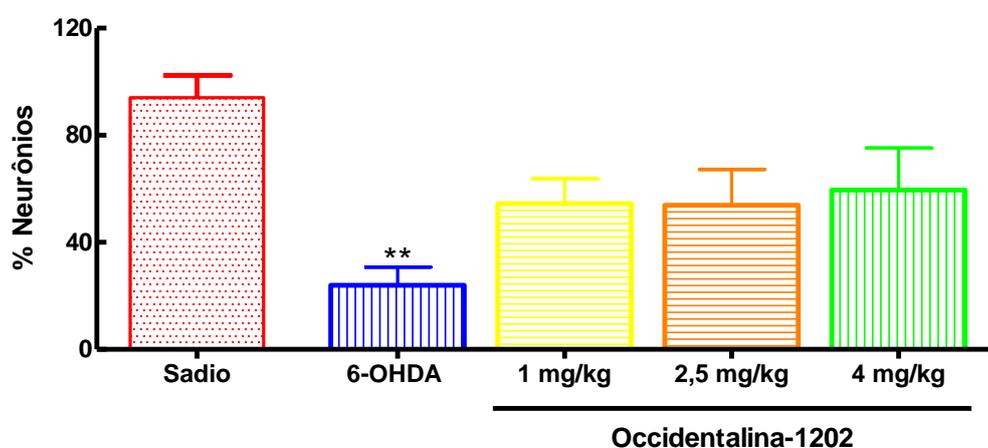


Figura 7: Determinação pela porcentagem de neurônios dopaminérgicos viáveis imunoreativos a TH em fatias cerebrais da região SN. Grupos controles: 6-OHDA+veículo (6-OHDA, n=8) e Sadio (Sadio, n=6). Grupo OcTx-1202 1 mg/kg (n=4), 2,5 mg/kg (n=8), 4mg/kg (n=6) Grupos com diferenças significativas ** ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle 6-OHDA + Veículo (One-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey [$F_{(4,29)}=4,606$; $p=0,0053$]).

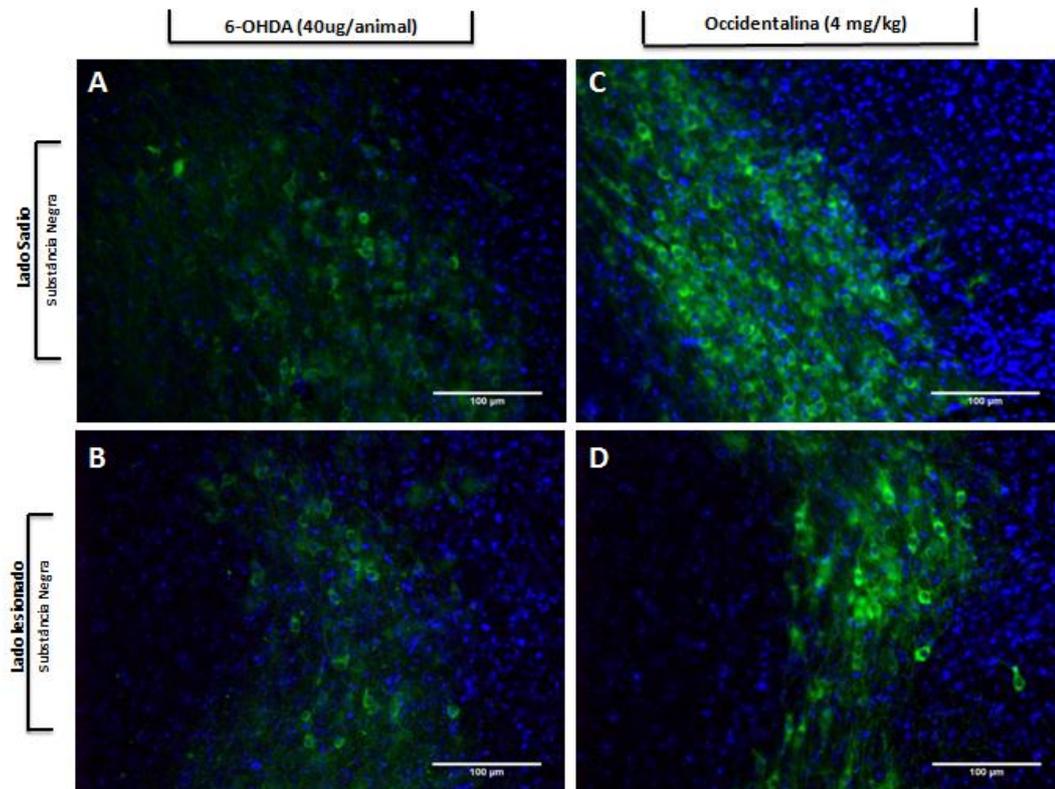


Figura 8: Imagem representativa com marcação dos neurônios dopaminérgicos reativos a enzima TH. A: Grupo 6-OHDA (40 ug/animal) do lado sadio e em B neurônios imunomarcados do lado lesado; C: Grupo tratamento OcTx-1202 4 mg/kg com a imagem do lado sadio e em D do lado lesado.

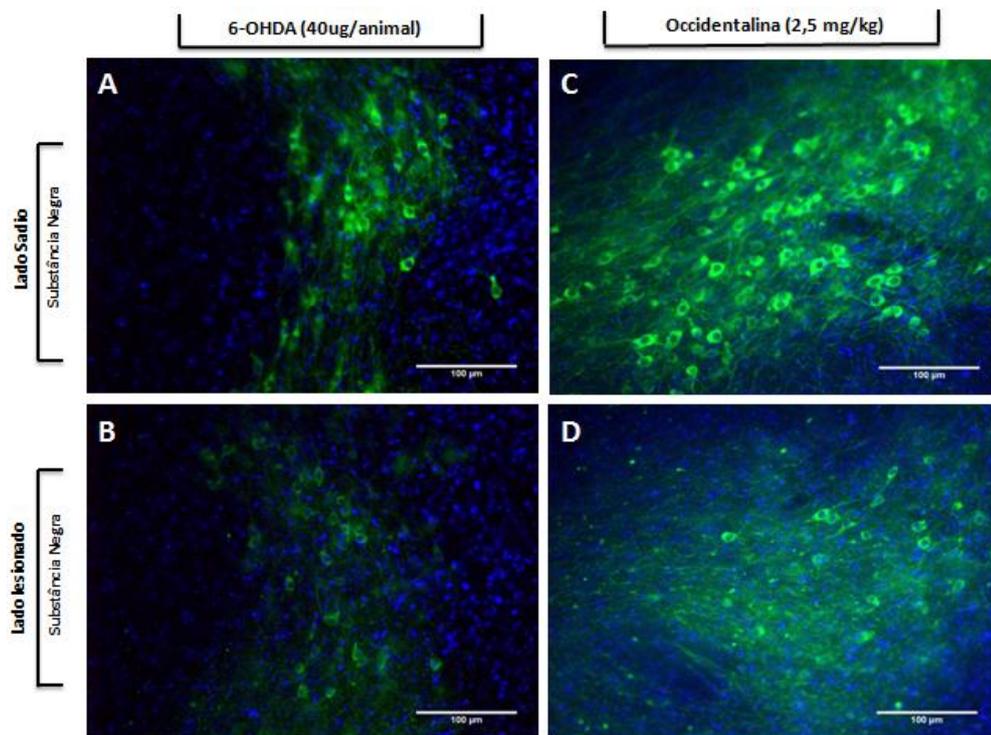


Figura 9 Imagem representativa com marcação dos neurônios dopaminérgicos reativos a enzima TH. A: Grupo 6-OHDA (40ug/animal) do lado sadio e em B neurônios imunomarcados do lado lesado; C: Grupo tratamento OcTx-1202 2,5 mg/kg com a imagem do lado sadio e em D do lado lesado.

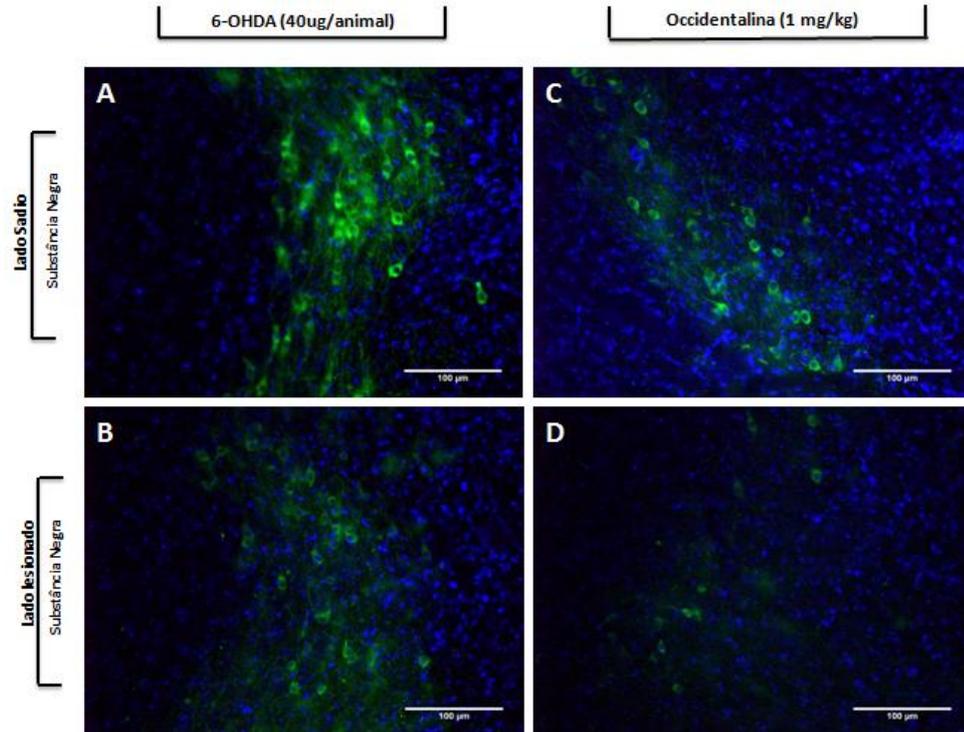


Figura 10: Imagem representativa com marcação dos neurônios dopaminérgicos reativos a enzima TH. A: Grupo 6-OHDA (40ug/animal) do lado sadio e em B neurônios imunomarcados do lado lesado; C: Grupo tratamento OcTx-1202 1 mg/kg com a imagem do lado sadio e em D do lado lesado.

Discussão

5. Discussão

Tendo em vista o aumento na incidência de doenças neurodegenerativas, principalmente entre os idosos, o desenvolvimento de novas terapias eficazes para essas desordens se faz necessário. Compostos extraídos de peçonhas representam uma alternativa interessante, uma vez que essas moléculas são caracterizadas por apresentarem um repertório vasto de atividades biológicas. Em especial, peptídeos bioativos apresentam características relevantes, podendo agir tanto como agentes neuroprotetores como moduladores de resposta imunológica (SILVA et al., 2015). Muitas dessas doenças, como a DP e Doença de Alzheimer, apresentam características patológicas complexas que envolvem uma série de mecanismos distintos, como a formação de agregados proteicos e o aumento da resposta neuroinflamatória (GANGULY et al., 2017). Assim, esses compostos representam alternativas promissoras no delineamento de fármacos para o tratamento de doenças neurodegenerativas, em especial a DP.

Nesse sentido, uma série de experimentos vem sendo realizados com o intuito de investigar peptídeos bioativos com potencial atividade neuroprotetora e /ou neuroresgatadora. A peçonha bruta da abelha *Apis mellifera* (Apitoxina) mostrou resultados notáveis em estudos realizados com o objetivo de tratar a DP (CHO et al., 2012; SILVA et al., 2015; AWAD et al., 2017). A aplicação da peçonha bruta dessa abelha como medicina tradicional tem suas origens desde a antiga China e Grécia (SON et al., 2007). Seus usos baseavam-se na aplicação para o alívio de dor e tratamento de doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatóide (LEE et al., 2001). Além disso, sugere-se que a apitoxina apresente várias características farmacológicas, como propriedades antiinflamatórias, antimutagênicas, antinociceptivas e radioprotetoras (CORNARA et al., 2017).

Dessa forma, vários estudos experimentais já evidenciaram a potencial atividade da apitoxina como modulador neuroinflamatório e agente neuroprotetor. Chung e colaboradores (2012) relataram a sua capacidade em aumentar a proporção de células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ Fosp3 (Tregs) no modelo de indução de DP pela neurotoxina MPTP (CHUNG et al., 2012). Kim e colaboradores (2016) mostraram o efeito neuroprotetor da apitoxina, uma vez que reduziu a ativação de astrócitos em um modelo murino de DP subcrônico induzido por MPTP

(KIM et al., 2016). Além disso, nesse mesmo modelo murino de DP, a peçonha da *Apis mellifera* também foi capaz de manter a porcentagem de neurônios reativos a tirosina hidroxilase no SNpc e atenuar a resposta microglial, demonstrando sua atividade antineuroinflamatória e neuroprotetora (KIM et al., 2011). O uso da apitoxina para o tratamento da DP já se encontra em fase de estudos clínicos (CHO et al., 2012; DOO et al., 2015)

Outro composto que também vem sendo bastante estudado para o tratamento da DP é o peptídeo exendina-4, extraído da saliva do *Heloderma suspectum* conhecido como monstro de Gila (ENG et al., 1992). Esse peptídeo é composto por 39 resíduos de aminoácidos e um de seus efeitos está associado com a ligação ao receptor GLP-1 (glucagon-like peptide 1). Esses receptores são encontrados distribuídos no SNC e estudos indicam que a sua ativação está envolvida na neurogênese (GOKE et al., 1993; PARTHSARATHY; HÖLSCHER, 2013), redução da neuroinflamação e do estresse oxidativo (INOUE et al., 2015; LI et al., 2016b), inibição da apoptose (CHANG et al., 2016; LI et al., 2016a) e aumento da plasticidade sináptica (PORTER et al., 2013; IWAI et al., 2014).

Dessa forma, ensaios realizados em modelos *in vitro* (LI et al., 2009, 2010) e *in vivo* (BERTILSSON et al., 2008; HARKAVYI et al., 2008; KIM; MOON; PARK, 2009) demonstraram uma atividade neuroprotetora após a administração de Exenatide (peptídeo sintético similar à exendina-4) em modelos de DP. Além disso, o Exenatide já se encontra em fase de pesquisa clínica como potencial tratamento em pacientes portadores da DP (AVILES-OLMOS et al., 2013a, 2013b).

A peçonha e alguns peptídeos isolados de vespas já foram identificados com potencial ação no SNC, podendo agir como antinociceptivos e anticonvulsivantes. A peçonha desnaturada da vespa *Polybia ignobilis*, quando injetada por via intracerebro ventricular (i.c.v) foi capaz de proteger contra crises epiléticas induzidas por três convulsivantes químicos diferentes em ratos. Além disso, também foi evidenciada afinidade dessa peçonha com receptores GABAérgicos e glutamatérgicos (SIQUEIRA CUNHA et al., 2005). O peptídeo Thr⁶-bradicinina, isolado da peçonha da *Polybia occidentalis*, mostrou promissora atividade antinociceptiva dose e tempo dependente, em que se observou que o composto foi 4

vezes mais potente que a bradicinina e 3 vezes mais potente que a morfina (MORTARI et al., 2007a).

Outra peçonha de vespa que também demonstrou potencial atividade sobre o SNC foi a extraída da vespa social *Agelaia vicina* (família Vespidae). Pizzo e colaboradores (2000) demonstraram que essa peçonha foi capaz de diminuir a captação de GABA e de glutamato em sinaptossomas de córtices cerebrais de rato de maneira não-competitiva (PIZZO et al., 2000). Dois peptídeos foram identificados a partir da peçonha da vespa *Agelaia vicina*. O primeiro, chamado de AvTx8 (40 µmol/rato), foi identificado como modulador da resposta de aversão a partir do bloqueio de receptores GABA do colículo superior (DE OLIVEIRA et al., 2005). O segundo peptídeo, chamado AvTx7, apresentou atividade sobre o glutamato, diminuindo a sua captação de maneira não-competitiva. Dessa forma, o peptídeo aumenta a liberação deste neurotransmissor, possivelmente através da ligação sobre canais de potássio (PIZZO et al., 2004).

Até o momento, poucos estudos foram realizados com relação à atividade antiparkinsoniana de peptídeos isolados da peçonha de vespas. Para tanto, considerando o vasto repertório de atividades biológicas que essas peçonhas podem apresentar, o desenvolvimento de fármacos com base nesses compostos se torna uma alternativa atrativa para o tratamento de desordens neurodegenerativas.

O peptídeo OcTx-1202, isolado da peçonha da vespa *Polybia occidentalis*, é um composto com potencial atividade terapêutica para doenças neurológicas. Estudos realizados com esse composto mostraram sua potencial atividade antiepiléptica, podendo também apresentar uma atividade neuroprotetora contra a neurodegeneração (MORTARI, 2007). Além disso, estudos mais recentes também determinaram a atividade antiepiléptica dose-dependente do peptídeo sintético OcTx-1202, sequência similar ao composto natural, em modelo de crises induzidas pelo ácido caínico em roedores (CARNEIRO, 2013). O ácido caínico é um agonista de receptores para o glutamato dos tipos cainato/AMPA que podem provocar crises tônico-clônicas generalizadas quando injetados por via *i.c.v.* (DE DEYN et al., 1992). Além disso, um dos principais mecanismos de neurodegeneração relacionados ao ácido caínico é a excitotoxicidade glutamatérgica (ZHU et al., 2011).

Tendo em vista que um dos mecanismos patológicos sugeridos na DP é a excitotoxicidade glutamatérgica (MEHTA et al., 2013), o fato da OcTx-1202 ter apresentado evidências de atividade neuroprotetora sobre um modelo de indução de crises epilépticas por ácido caínico, pode sugerir a capacidade do peptídeo em agir sobre esse mecanismo. Portanto, a OcTx-1202 representa uma alternativa interessante como fármaco para o tratamento da DP

Assim sendo, o seguinte trabalho teve como objetivo a avaliação antiparkinsoniana do peptídeo OcTx-1202 em modelo murino da DP, por meio de dois ensaios comportamentais e uma avaliação imunohistoquímica. Para tanto, os experimentos realizados objetivaram analisar a capacidade do composto em proteger os neurônios dopaminérgicos contra a morte e sua capacidade em aliviar os sintomas motores causados pela neurotoxina 6-OHDA.

A escolha do modelo de 6-OHDA para a indução do parkinsonismo foi devido principalmente à sua alta seletividade para provocar a morte neuronal na região da SN (BLANDINI; ARMENTERO, 2012). Outra vantagem é o fato dessa neurotoxina causar lesão unilateral, afetando apenas um hemisfério cerebral do animal, no caso, o esquerdo. Dessa forma, esse modelo possibilita uma análise quanto à capacidade do composto estudado em interferir na progressão de perda dos neurônios dopaminérgicos, permitindo o uso do hemisfério contralateral à lesão como controle. Assim, o modelo de indução do parkinsonismo pela neurotoxina 6-OHDA usada neste trabalho mostrou-se eficiente, uma vez que os animais do grupo 6-OHDA + veículo apresentaram alterações significativas em relação ao grupo sadio em todos os ensaios realizados.

O primeiro experimento selecionado para avaliação antiparkinsoniana do peptídeo OcTx-1202 foi o teste de alteração motora durante o período de 6 horas no aparelho Rotarod. Esse ensaio tem a finalidade de identificar a melhora na atividade locomotora dos animais, avaliando o equilíbrio dinâmico; a coordenação motora; o planejamento motor; a aprendizagem motora e as condições físicas gerais (PINTO; KO, 2012). Os dados obtidos neste experimento indicaram que as duas menores doses testadas da OcTx-1202 não foram capazes de melhorar a atividade motora dos animais. No entanto, os animais tratados com a maior dose mostraram uma melhora no quadro locomotor 30 minutos depois do início do teste. Isso indica que,

nessa dose, o peptídeo pode apresentar o seu pico de ação em 1 hora, quando administrado pela via s.c., podendo agir de forma a aliviar os sinais motores. Vale ressaltar que na terceira administração do peptídeo, os animais recebem a OcTx-1202 trinta minutos antes do início deste ensaio. A administração do composto é realizada três vezes, em três dias diferentes e sempre no mesmo horário, sendo a primeira 60 minutos após o procedimento neurocirúrgico e a segunda e terceira administrações no terceiro e quinto dia respectivamente após o insulto.

Interessantemente, estudos realizados por Biolchi (2013) mostraram que a L-DOPA apresenta efeitos similares de pico de descoordenação motora quando aplicada sobre o mesmo protocolo de experimento. Nesse estudo, os animais lesionados pela 6-OHDA foram tratados pela via intraperitoneal com a L-DOPA, recebendo duas doses diárias do fármaco no turno matutino e vespertino junto com a Benzerazida, inibidor periférico da enzima MAO-B (BIOLCHI, 2013).

Sabe-se que em modelos *in vivo* de hemiparkinsonismo com administração de L-DOPA, os animais podem desenvolver discinesias por meio de comportamentos hipercinéticos e distônicos. Segundo Cenci & Crossman (2018), o aumento na liberação de dopamina no corpo do estriado, pela administração da L-DOPA em modelos animais de DP, está relacionado com a reprodução de movimentos involuntários (CENCI; CROSSMAN, 2018).

Além disso, Lundblad (2004) avaliou a indução de movimentos involuntários anormais pelo tratamento crônico de L-DOPA, em um modelo de administração de 6-OHDA nas regiões do feixe prosencefálico medial e do estriado de camundongos. O estudo demonstrou que nos testes de desempenho motor, as doses de 6mg/kg e de 8mg/kg de L-DOPA foram capazes de gerar movimentos involuntários da pata dianteira contralateral a lesão (LUNDBLAD et al., 2005).

Dessa forma, a OcTx-1202 pode ter agido de forma a aliviar os sinais motores causados pela 6-OHDA. Porém, assim como a L-DOPA, após esse efeito ter se atenuado, o peptídeo pode ter levado ao desenvolvimento de movimentos discinéticos, já que os animais voltaram a ter uma piora no quadro motor após o pico de ação.

O segundo ensaio selecionado neste trabalho foi o de indução de comportamento rotatório após a administração do agonista dopaminérgico apomorfina. Nesse experimento, os animais lesionados unilateralmente tendem a apresentar giros contralaterais devido à diferença na proporção de neurônios dopaminérgicos na região da SN. Dessa forma, este método fornece uma sinalização fidedigna com relação ao grau da lesão induzida no animal (SCHWARTING; HUSTON, 1996). Além disso, o teste de apomorfina também avalia a capacidade do composto estudado em proteger os neurônios contra a morte celular.

Nesse experimento, observou-se uma redução drástica com relação ao número total de giros dos animais que receberam a dose intermediária e maior dose da OcTx-1202, quando comparado com o grupo 6-OHDA + veículo. No entanto, nos camundongos que receberam a menor dose do peptídeo, o tratamento não foi eficaz, visto que a quantidade de giros não apresentou diferença significativa com o grupo 6-OHDA + veículo. Dessa forma, em ambas as doses de 2,5 e 4 mg/kg, a OcTx-1202 possivelmente foi capaz de preservar os neurônios dopaminérgicos da SN e as enervações para o estriado.

O último experimento realizado foi o de imunofluorescência, que consiste na determinação de neurônios dopaminérgicos viáveis na região da SN. A vantagem deste ensaio é que ele possibilita uma complementação com relação aos ensaios comportamentais de avaliação neuroprotetora. Kim e colaboradores (2016) avaliaram a atividade neuroprotetora da peçonha bruta da abelha *Apis mellifera* pela quantificação de neurônios dopaminérgicos por essa mesma técnica em modelo murino de MPTP da DP. Nesse estudo, foi possível identificar um aumento de 78% dos neurônios na região da SNpc quando comparado com os animais saudáveis (KIM et al., 2016).

No entanto, no seguinte trabalho foi possível observar que apesar do aumento da porcentagem de neurônios reativos à TH nos grupos tratados com a OcTx-1202, essa diferença não obteve significância quando comparado ao grupo controle. Além disso, o número de neurônios dopaminérgicos apresentado pelos animais tratados em todas as doses foi menor que o grupo sadio. Dessa forma, o peptídeo OcTx-

1202 não foi capaz de reproduzir uma atividade neuroprotetora consistente no modelo murino de hemiparkinsonismo da 6-OHDA.

Portanto, apesar da OcTx-1202 não ter apresentado atividade neuroprotetora significativa, o peptídeo ainda foi capaz de aliviar os sinais motores, como foi evidenciado no teste de permanência de 6 horas no aparelho Rotarod com o uso da maior dose (4 mg/kg). Além disso, o perfil similar da OcTx-1202 com a L-DOPA observado nesse ensaio, sugere que o peptídeo possa apresentar efeitos neurotóxicos de indução de movimentos discinéticos nos animais. Ainda assim, novos experimentos serão realizados a fim de se ter evidências mais claras com relação às atividades farmacológicas da OcTx-1202 e avaliar atividade neurotóxica do peptídeo.

Conclusões

6. Conclusões

Neste estudo, constatou-se que o peptídeo Occidentalina-1202 demonstrou um efeito antiparkinsoniano relevante, uma vez que ambas as maiores doses (2,5 e 4 mg/kg) foram capazes de diminuir o número de rotações contralaterais apresentados pelos animais. No entanto, no teste de marcação dos neurônios dopaminérgicos, o composto não foi capaz de demonstrar uma proteção significativa das células. Além disso, segundo o teste de alteração motora os animais que receberam a maior dose da OcTx-1202 obtiveram uma melhora inicial no quadro motor, sugerindo um alívio nos sinais motores.

Dessa forma, novos testes ainda precisam ser realizados com a finalidade de avaliar possíveis atividades neurotóxicas do composto e para se ter evidências mais claras com relação às atividades antiparkinsoniana da OcTx-1202.

7. Referência Bibliográfica

- AARSLAND, D.; CREESE, B.; POLITIS, M.; CHAUDHURI, K. R.; DOMINIC, H.; WEINTRAUB, D.; BALLARD, C.; PARK, D. C.; PARK, D. C.; GROUP, I. HHS Public Access. v. 13, n. 4, p. 217–231, 2018.
- ABELIOVICH, A.; SCHMITZ, Y.; FARINAS, I.; CHOI-LUNDBERG, D.; HO, W. H.; CASTILLO, P. E.; SHINSKY, N.; VERDUGO, J. M.; ARMANINI, M.; RYAN, A.; HYNES, M.; PHILLIPS, H.; SULZER, D.; ROSENTHAL, A. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. **Neuron**, 2000.
- ALVAREZ-FISCHER, D.; HENZE, C.; STRENZKE, C.; WESTRICH, J.; FERGER, B.; HÖGLINGER, G. U.; OERTEL, W. H.; HARTMANN, A. Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and α -synuclein-deleted mice. **Experimental Neurology**, 2008.
- ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, L.; LÓPEZ-HOYOS, M.; MUÑOZ-CACHO, P.; MARTÍNEZ-TABOADA, V. M. Aging is associated with circulating cytokine dysregulation. **Cellular Immunology**, 2012.
- AMMAL KAIDERY, N.; THOMAS, B. Current perspective of mitochondrial biology in Parkinson's disease. **Neurochemistry International**, 2018.
- AMOR, S.; PEFFEROEN, L. A. N.; VOGEL, D. Y. S.; BREUR, M.; VAN DER VALK, P.; BAKER, D.; VAN NOORT, J. M. Inflammation in neurodegenerative diseases - an update. **Immunology**, 2014.
- ANGOT, E.; STEINER, J. A.; HANSEN, C.; LI, J. Y.; BRUNDIN, P. **Are synucleinopathies prion-like disorders?** **The Lancet Neurology**, 2010. .
- AQUILONIUS, S. M.; NYHOLM, D. Development of new levodopa treatment strategies in Parkinson's disease—from bedside to bench to bedside. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 122, n. 2, p. 71–77, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03009734.2017.1285374>>.
- ARUNDINE, M.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. **Cell Calcium**, v. 34, n. 4–5, p. 325–337, 2003.

AVILES-OLMOS, I.; DICKSON, J.; KEFALOPOULOU, Z.; DJAMSHIDIAN, A.; ELL, P.; SODERLUND, P.; WHITTON, P.; WYSE, R.; ISAACS, T.; LEES, A.; LIMOUSIN, P.; FOLTYNIE, T. Exenatide and the treatment of patients with Parkinson's disease. **The Journal of ...**, v. 123, n. 6, p. 2370–2736, 2013a. Disponível em: <http://www.jci.org/articles/view/68295?utm_campaign=impact_2013_june&utm_content=short_url&utm_medium=pdf&utm_source=impact>.

AVILES-OLMOS, I.; DICKSON, J.; KEFALOPOULOU, Z.; DJAMSHIDIAN, A.; ELL, P.; SODERLUND, T.; WHITTON, P.; WYSE, R.; ISAACS, T.; LEES, A.; LIMOUSIN, P.; FOLTYNIE, T. Exenatide and the treatment of patients with Parkinson's disease. **The Journal of clinical investigation**, 2013b.

AWAD, K.; ABUSHOUK, A. I.; ABDELKARIM, A. H.; MOHAMMED, M.; NEGIDA, A.; SHALASH, A. S. Bee venom for the treatment of Parkinson's disease: How far is it possible? **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 91, p. 295–302, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.065>>.

BELEBONI, R. D. O.; PIZZO, A. B.; FONTANA, A. C. K.; CAROLINO, R. D. O. G.; COUTINHO-NETTO, J.; DOS SANTOS, W. F. **Spider and wasp neurotoxins: Pharmacological and biochemical aspects** **European Journal of Pharmacology**, 2004. .

BERG, D.; POSTUMA, R. B.; ADLER, C. H.; BLOEM, B. R.; CHAN, P.; DUBOIS, B.; GASSER, T.; GOETZ, C. G.; HALLIDAY, G.; JOSEPH, L.; LANG, A. E.; LIEPELT-SCARFONE, I.; LITVAN, I.; MAREK, K.; OBESO, J.; OERTEL, W.; OLANOW, C. W.; POEWE, W.; STERN, M.; DEUSCHL, G. **MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease** **Movement Disorders**, 2015. .

BERTILSSON, G.; PATRONE, C.; ZACHRISSON, O.; ANDERSSON, A.; DANNAEUS, K.; HEIDRICH, J.; KORTESMAA, J.; MERCER, A.; NIELSEN, E.; RÖNNHOLM, H.; WIKSTRÖM, L. Peptide hormone exendin-4 stimulates subventricular zone neurogenesis in the adult rodent brain and induces recovery in an animal model of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, n. 2, p. 326–338, 2008.

BERTLER, A. ; ROSENGREN, E. On the distribution in brain of monoamines and of enzymes responsible for their formation. **Experientia**, 1959.

BIOLCHI, A. M. Avaliação antiparkinsoniana e neuroprotetora do peptídeo Fraternina isolado da peçonha da vespa *Parachartergus fraternus* no modelo murino da Doença de Parkinson. p. 115, 2013.

BIRKMAYER, W.; HORNYKIEWICZ, O. Der L-Dioxyphenylalanin (=L-DOPA)-Effekt beim Parkinson-Syndrom des Menschen: Zur Pathogenese und Behandlung der Parkinson-Akinese. **Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten Vereinigt mit Zeitschrift für die Gesamte Neurologie und Psychiatrie**, 1962.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M.-T. Animal models of Parkinson's disease. **FEBS Journal**, v. 279, n. 7, p. 1156–1166, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2012.08491.x>>.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: News from the past. **Parkinsonism and Related Disorders**, 2008.

BLOCK, M. L.; HONG, J.-S. Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1127–1132, 2007. Disponível em: <<http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/BST0351127>>.

BOSE, A.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, p. 216–231, 2016.

BRUNDIN, P.; MELKI, R.; KOPITO, R. **Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010. .

CALABRESI, P.; FILIPPO, M. Di; GHIGLIERI, V.; TAMBASCO, N.; PICCONI, B. **Levodopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease: Filling the bench-to-bedside gap** *The Lancet Neurology*, 2010. .

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. **3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists [16]** *Nature*, 1957. .

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.

CENCI, M. A.; CROSSMAN, A. R. Animal models of <sc>l</sc> -dopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 00, n. 00, p. 1–11, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mds.27337>>.

CHANG, T. J.; TSENG, H. C.; LIU, M. W.; CHANG, Y. C.; HSIEH, M. L.; CHUANG, L. M. Glucagon-like peptide-1 prevents methylglyoxal-induced apoptosis of beta cells through improving mitochondrial function and suppressing prolonged AMPK activation. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

CHEN, C. J.; LIAO, S. L.; KUO, J. S. Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, n. 4, p. 1557–1565, 2000.

CHO, S. Y.; SHIM, S. R.; RHEE, H. Y.; PARK, H. J.; JUNG, W. S.; MOON, S. K.; PARK, J. M.; KO, C. N.; CHO, K. H.; PARK, S. U. Effectiveness of acupuncture and bee venom acupuncture in idiopathic Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 18, n. 8, p. 948–952, 2012.

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

CONNOLLY, N. M. C.; THEUREY, P.; ADAM-VIZI, V.; BAZAN, N. G.; BERNARDI, P.; BOLAÑOS, J. P.; *et al.* Guidelines on experimental methods to assess mitochondrial dysfunction in cellular models of neurodegenerative diseases. **Cell Death & Differentiation**, 2017.

CORNARA, L.; BIAGI, M.; XIAO, J.; BURLANDO, B. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. JUN, p. 1–20, 2017.

DA CONCEIÇÃO, F. S. L.; NGO-ABDALLA, S.; HOUZEL, J.-C.; REHEN, S. K. Murine Model for Parkinson's Disease: from 6-OH Dopamine Lesion to Behavioral Test. **Journal of Visualized Experiments**, 2010.

DE DEYN, P. P.; D'HOOGHE, R.; MARESCAU, B.; PEI, Y. Q. Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants. **Epilepsy Research**, 1992.

DE OLIVEIRA, L.; CUNHA, A. O. S.; MORTARI, M. R.; PIZZO, A. B.; MIRANDA, A.; COIMBRA, N. C.; DOS SANTOS, W. F. Effects of microinjections of neurotoxin AvTx8, isolated from the social wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) venom, on GABAergic nigrothalamic pathways. **Brain Research**, 2005.

DENG, H.; WANG, P.; JANKOVIC, J. The genetics of Parkinson disease. **Ageing Research Reviews**, v. 42, n. December 2017, p. 72–85, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.12.007>>.

DEVOS, D.; MOREAU, C.; DUJARDIN, K.; CABANTCHIK, I.; DEFEBVRE, L.; BORDET, R. New pharmacological options for treating advanced parkinson's disease. **Clinical Therapeutics**, v. 35, n. 10, p. 1640–1652, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2013.08.011>>.

DIKIY, I.; ELIEZER, D. **Folding and misfolding of alpha-synuclein on membranes***Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2012. .

DOO, K.-H.; LEE, J.-H.; CHO, S.-Y.; JUNG, W.-S.; MOON, S.-K.; PARK, J.-M.; KO, C.-N.; KIM, H.; PARK, H.-J.; PARK, S.-U. A Prospective Open-Label Study of Combined Treatment for Idiopathic Parkinson's Disease Using Acupuncture and Bee Venom Acupuncture as an Adjunctive Treatment. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 21, n. 10, p. 598–603, 2015. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/acm.2015.0078>>.

EHRINGER, H.; HORNYKIEWICZ, O. Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. **Parkinsonism and Related Disorders**, 1998.

ENG, J.; KLEINMAN, W. A.; SINGH, L.; SINGH, G.; RAUFMAN, J. P. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom: Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 11, p. 7402–7405, 1992.

FERRUCCI, L.; CORSI, A.; LAURETANI, F.; BANDINELLI, S.; BARTALI, B.; TAUB, D. D.; GURALNIK, J. M.; LONGO, D. L. The origins of age-related proinflammatory state. **Blood**, 2005.

FRY, B. G.; ROELANTS, K.; CHAMPAGNE, D. E.; SCHEIB, H.; TYNDALL, J. D. A.;

KING, G. F.; NEVALAINEN, T. J.; NORMAN, J. A.; LEWIS, R. J.; NORTON, R. S.; RENJIFO, C.; DE LA VEGA, R. C. R. The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 10, n. 1, p. 483–511, 2009.

GANGULY, G.; CHAKRABARTI, S.; CHATTERJEE, U.; SASO, L. Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: Cross talk in alzheimer's disease and parkinson's disease. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 797–810, 2017.

GHAVAMI, S.; SHOJAEI, S.; YEGANEH, B.; ANDE, S. R.; JANGAMREDDY, J. R.; MEHRPOUR, M.; CHRISTOFFERSSON, J.; CHAABANE, W.; MOGHADAM, A. R.; KASHANI, H. H.; HASHEMI, M.; OWJI, A. A.; ŁOS, M. J. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. **Progress in Neurobiology**, v. 112, p. 24–49, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.10.004>>.

GLASS, C. K.; SAIJO, K.; WINNER, B.; MARCHETTO, M. C.; GAGE, F. H. **Mechanisms Underlying Inflammation in NeurodegenerationCell**, 2010. .

GOKE, R.; FEHMANN, H. C.; LINN, T.; SCHMIDT, H.; KRAUSE, M.; ENG, J.; GOKE, B. Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting β -cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 26, p. 19650–19655, 1993.

GONZALEZ, J.; JURADO-CORONEL, J. C.; ÁVILA, M. F.; SABOGAL, A.; CAPANI, F.; BARRETO, G. E. NMDARs in neurological diseases: A potential therapeutic target. **International Journal of Neuroscience**, v. 125, n. 5, p. 315–327, 2015.

GREENAMYRE, J. T.; CANNON, J. R.; DROLET, R.; MASTROBERARDINO, P. G. **Lessons from the rotenone model of Parkinson's diseaseTrends in Pharmacological Sciences**, 2010. .

GROSCH, J.; WINKLER, J.; KOHL, Z. Early Degeneration of Both Dopaminergic and Serotonergic Axons – A Common Mechanism in Parkinson's Disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, n. December, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2016.00293/full>>.

HARKAVYI, A.; ABUIRMEILEH, A.; LEVER, R.; KINGSBURY, A. E.; BIGGS, C. S.; WHITTON, P. S. Glucagon-like peptide 1 receptor stimulation reverses key deficits in distinct rodent models of Parkinson's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, 2008.

HAUSER, R. A.; HERITIER, S.; ROWSE, G. J.; HEWITT, L. A.; ISAACSON, S. H. Droxidopa and reduced falls in a trial of Parkinson disease patients with neurogenic orthostatic hypotension. **Clinical Neuropharmacology**, v. 39, n. 5, p. 220–226, 2016.

HIRSCH, E. C.; VYAS, S. Parkinsonism and Related Disorders Neuroinflammation in Parkinson ' s disease. v. 1, p. 210–212, 2012.

INOUE, T.; INOBUCHI, T.; SONODA, N.; HENDARTO, H.; MAKIMURA, H.; SASAKI, S.; YOKOMIZO, H.; FUJIMURA, Y.; MIURA, D.; TAKAYANAGI, R. GLP-1 analog liraglutide protects against cardiac steatosis, oxidative stress and apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats. **Atherosclerosis**, v. 240, n. 1, p. 250–259, 2015.

IWAI, T.; SAWABE, T.; TANIMITSU, K.; SUZUKI, M.; SASAKI-HAMADA, S.; OKA, J. I. Glucagon-like peptide-1 protects synaptic and learning functions from neuroinflammation in rodents. **Journal of Neuroscience Research**, v. 92, n. 4, p. 446–454, 2014.

JACKSON-LEWIS, V.; BLESA, J.; PRZEDBORSKI, S. Animal models of Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 18, p. S183–S185, 2012.
Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1353802011700578>>.

JENNER, P.; OLANOW, C. W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurology**, 1996.

JOST, W. H.; REICHMANN, H. "An essay on the shaking palsy" 200 years old. **Journal of Neural Transmission**, v. 124, n. 8, p. 899–900, 2017.

KARIMI-MOGHADAM, A.; CHARSOUEI, S.; BELL, B.; JABALAMELI, M. R. Parkinson Disease from Mendelian Forms to Genetic Susceptibility: New Molecular Insights into the Neurodegeneration Process. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 0, n. 0, p. 1–26, 2018. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1007/s10571-018-0587-4>>.

KEW, J. N. C. Positive and negative allosteric modulation of metabotropic glutamate receptors: emerging therapeutic potential. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 104, n. 3, p. 233–244, 2004. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725804001275>>.

KIM, C.; HO, D. H.; SUK, J. E.; YOU, S.; MICHAEL, S.; KANG, J.; LEE, S. J.; MASLIAH, E.; HWANG, D.; LEE, H. J.; LEE, S. J. Neuron-released oligomeric α -synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. **Nature Communications**, 2013.

KIM, C.; LEE, S.-J. Controlling the mass action of alpha-synuclein in Parkinson's disease. **Journal of neurochemistry**, 2008.

KIM, J. I.; YANG, E. J.; LEE, M. S.; KIM, Y. S.; HUH, Y.; CHO, I. H.; KANG, S.; KOH, H. K. Bee venom reduces neuroinflammation in the MPTP-induced model of Parkinson's disease. **International Journal of Neuroscience**, v. 121, n. 4, p. 209–217, 2011.

KIM, M. E.; LEE, J. Y.; LEE, K. M.; PARK, H. R.; LEE, E.; LEE, Y.; LEE, J. S.; LEE, J. Neuroprotective effect of bee venom is mediated by reduced astrocyte activation in a subchronic MPTP-induced model of Parkinson's disease. **Archives of Pharmacal Research**, v. 39, n. 8, p. 1160–1170, 2016.

KIM, S.; MOON, M.; PARK, S. Exendin-4 protects dopaminergic neurons by inhibition of microglial activation and matrix metalloproteinase-3 expression in an animal model of Parkinson's disease. **Journal of Endocrinology**, v. 202, n. 3, p. 431–439, 2009.

LANGSTON, J.; BALLARD, P.; TETRUD, J.; IRWIN, I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science**, 1983.

LE, W.; SAYANA, P.; JANKOVIC, J. **Animal Models of Parkinson's Disease: A Gateway to Therapeutics? Neurotherapeutics**, 2014. .

LEE, H.; ZHU, X.; CASADESUS, G.; PALLÀS, M.; CAMINS, A.; O'NEILL, M. J.; NAKANISHI, S.; PERRY, G.; SMITH, M. A. The effect of mGluR2 activation on signal transduction pathways and neuronal cell survival. **Brain Research**, v. 1249, p. 244–

250, 2009. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000689930802605X>>.

LEE, J. H.; KWON, Y. B.; HAN, H. J.; MAR, W. C.; LEE, H. J.; YANG, I. S.; BEITZ, a J.; KANG, S. K. Bee venom pretreatment has both an antinociceptive and anti-inflammatory effect on carrageenan-induced inflammation. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 63, n. 3, p. 251–259, 2001.

LEES, A. J.; SELIKHOVA, M.; ANDRADE, L. A.; DUYCKAERTS, C. The black stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff. **Movement Disorders**, v. 23, n. 6, p. 777–783, 2008.

LEVERENZ, J. B.; QUINN, J. F.; ZABETIAN, C.; ZHANG, J.; MONTINE, K. S.; MONTINE, T. J. Cognitive impairment and dementia in patients with Parkinson disease. **Current topics in medicinal chemistry**, 2009.

LI, H. T.; ZHAO, X. Z.; ZHANG, X. R.; LI, G.; JIA, Z. Q.; SUN, P.; WANG, J. Q.; FAN, Z. K.; LV, G. Exendin-4 Enhances Motor Function Recovery via Promotion of Autophagy and Inhibition of Neuronal Apoptosis After Spinal Cord Injury in Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 6, p. 4073–4082, 2016a.

LI, L.; ZHOU, F. M. Parallel dopamine D1 receptor activity dependence of l-Dopa-induced normal movement and dyskinesia in mice. **Neuroscience**, 2013.

LI, P. C.; LIU, L. F.; JOU, M. J.; WANG, H. K. The GLP-1 receptor agonists exendin-4 and liraglutide alleviate oxidative stress and cognitive and micturition deficits induced by middle cerebral artery occlusion in diabetic mice. **BMC Neuroscience**, v. 17, n. 1, 2016b.

LI, Y.; PERRY, T.; KINDY, M. S.; HARVEY, B. K.; TWEEDIE, D.; HOLLOWAY, H. W.; POWERS, K.; SHEN, H.; EGAN, J. M.; SAMBAMURTI, K.; BROSSI, A.; LAHIRI, D. K.; MATTSON, M. P.; HOFFER, B. J.; WANG, Y.; GREIG, N. H. GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular and rodent models of stroke and Parkinsonism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 4, p. 1285–1290, 2009. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0806720106>>.

LI, Y.; TWEEDIE, D.; MATTSON, M. P.; HOLLOWAY, H. W.; GREIG, N. H. Enhancing the GLP-1 receptor signaling pathway leads to proliferation and neuroprotection in human neuroblastoma cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 113, n. 6, p. 1621–1631, 2010.

LIPTON, S. a; ROSENBERG, P. a. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **The New England journal of medicine**, 1994.

LUNDBLAD, M.; USIELLO, A.; CARTA, M.; HÅKANSSON, K.; FISONE, G.; CENCI, M. A. Pharmacological validation of a mouse model of L-DOPA-induced dyskinesia. **Experimental Neurology**, 2005.

MAGRINELLI, F.; PICELLI, A.; TOCCO, P.; FEDERICO, A.; RONCARI, L.; SMANIA, N.; ZANETTE, G.; TAMBURIN, S. Pathophysiology of Motor Dysfunction in Parkinson's Disease as the Rationale for Drug Treatment and Rehabilitation. **Parkinson's Disease**, v. 2016, 2016.

MAITI, P.; MANNA, J.; DUNBAR, G. L. Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. **Translational Neurodegeneration**, v. 6, n. 1, p. 28, 2017. Disponível em: <<http://translationalneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40035-017-0099-z>>.

MANOHARAN, S.; GUILLEMIN, G. J.; ABIRAMASUNDARI, R. S.; ESSA, M. M.; AKBAR, M.; AKBAR, M. D. The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

MARINUS, J.; ZHU, K.; MARRAS, C.; AARSLAND, D.; HILTEN, J. J. Van. Review Risk factors for non-motor symptoms in Parkinson ' s disease. **The Lancet Global Health**, v. 4422, n. 18, 2018. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30127-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30127-3)>.

MARK, L. P.; PROST, R. W.; ULMER, J. L.; SMITH, M. M.; DANIELS, D. L.; STROTTMANN, J. M.; BROWN, W. D.; HACEIN-BEY, L. Pictorial review of glutamate excitotoxicity: Fundamental concepts for neuroimaging. **American**

Journal of Neuroradiology, v. 22, n. 10, p. 1813–1824, 2001.

MARSILI, L.; RIZZO, G.; COLOSIMO, C. **Diagnostic criteria for Parkinson's disease: From James Parkinson to the concept of prodromal disease***Frontiers in Neurology*, 2018. .

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

MCCANN, H.; CARTWRIGHT, H.; HALLIDAY, G. M. Neuropathology of α -synuclein propagation and braak hypothesis. **Movement Disorders**, v. 31, n. 2, p. 152–160, 2016.

MEHTA, A.; PRABHAKAR, M.; KUMAR, P.; DESHMUKH, R.; SHARMA, P. L. Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. **European Journal of Pharmacology**, v. 698, n. 1–3, p. 6–18, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.10.032>>.

MELKI, R. **Role of different alpha-synuclein strains in synucleinopathies, similarities with other neurodegenerative diseases***Journal of Parkinson's Disease*, 2015. .

MELLOR, I. R.; USHERWOOD, P. N. R. **Targeting ionotropic receptors with polyamine-containing toxins***Toxicon*, 2004. .

MHYRE, T. R.; NW, R.; BOYD, J. T.; HALL, G.; ROOM, C. **Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease**. [s.l: s.n.]v. 65

MOORS, T.; PACIOTTI, S.; CHIASSERINI, D.; CALABRESI, P.; PARNETTI, L.; BECCARI, T.; VAN DE BERG, W. D. J. Lysosomal Dysfunction and α -Synuclein Aggregation in Parkinson's Disease: Diagnostic Links. **Movement Disorders**, v. 31, n. 6, p. 791–801, 2016.

MORTARI, M. R.; CUNHA, A. O. S.; CAROLINO, R. O. G.; COUTINHO-NETTO, J.; TOMAZ, J. C.; LOPES, N. P.; COIMBRA, N. C.; DOS SANTOS, W. F. Inhibition of acute nociceptive responses in rats after i.c.v. injection of Thr 6-bradykinin, isolated from the venom of the social wasp, *Polybia occidentalis*. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, n. 6, p. 860–869, 2007a.

MORTARI, M. R.; CUNHA, A. O. S.; FERREIRA, L. B.; DOS SANTOS, W. F. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: From basic research to therapeutic application. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 114, n. 2, p. 171–183, 2007b.

OLIVAES. Livros Grátis. p. 57, 2010.

PARTHSARATHY, V.; HÖLSCHER, C. Chronic Treatment with the GLP1 Analogue Liraglutide Increases Cell Proliferation and Differentiation into Neurons in an AD Mouse Model. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. [s.l: s.n.]

PEREZ-LLORET, S.; PERALTA, M. C.; BARRANTES, F. J. Pharmacotherapies for Parkinson's disease symptoms related to cholinergic degeneration. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 17, n. 18, p. 2405–2415, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/14656566.2016.1254189>>.

PIMENTA, A. M. C.; DE LIMA, M. E. **Small peptides, big world: Biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms** **Journal of Peptide Science**, 2005. .

PINTO, W. B. V. de R.; KO, G. M. Teste De Rotarod: Contribuições No Estudo Das Doenças Neuromusculares, Das Síndromes Extrapiramidais E Das Ataxias Cerebelares. **Resbcal**, 2012.

PIZZO, a B.; FONTANA, a C.; COUTINHO-NETTO, J.; DOS SANTOS, W. F. Effects of the crude venom of the social wasp *Agelaia vicina* on gamma-aminobutyric acid and glutamate uptake in synaptosomes from rat cerebral cortex. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, 2000.

PIZZO, A. B.; BELEBONI, R. O.; FONTANA, A. C. K.; RIBEIRO, A. M.; MIRANDA, A.; COUTINHO-NETTO, J.; DOS SANTOS, W. F. Characterization of the actions of AvTx7 isolated from *Agelaia vicina* (hymenoptera: Vespidae) wasp venom on synaptosomal glutamate uptake and release. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, 2004.

PLAZA-ZABALA, A.; SIERRA-TORRE, V.; SIERRA, A. Autophagy and microglia: Novel partners in neurodegeneration and aging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, 2017.

POEWE, W.; SEPPI, K.; TANNER, C. M.; HALLIDAY, G. M.; BRUNDIN, P.; VOLKMANN, J.; SCHRAG, A. E.; LANG, A. E. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1–21, 2017.

PORTER, W. D.; FLATT, P. R.; HÖLSCHER, C.; GAULT, V. A. Liraglutide improves hippocampal synaptic plasticity associated with increased expression of Mash1 in ob/ob mice. **International Journal of Obesity**, v. 37, n. 5, p. 678–684, 2013.

POWERS, R.; LEI, S.; ANANDHAN, A.; MARSHALL, D. D.; WORLEY, B.; CERNY, R. L.; DODDS, E. D.; HUANG, Y.; PANAYIOTIDIS, M. I.; PAPPAS, A.; FRANCO, R. Metabolic investigations of the molecular mechanisms associated with Parkinson's disease. **Metabolites**, v. 7, n. 2, 2017.

PRELL, T. **Structural and functional brain patterns of non-motor syndromes in Parkinson's disease** *Frontiers in Neurology*, 2018. .

RANGO, M.; BRESOLIN, N. Brain Mitochondria, Aging, and Parkinson's Disease. **Genes**, v. 9, n. 5, p. 250, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2073-4425/9/5/250>>.

RANSOHOFF, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 777–783, 2016.

RAY CHAUDHURI, K.; QAMAR, M. A.; RAJAH, T.; LOEHRER, P.; SAUERBIER, A.; ODIN, P.; JENNER, P. Non-oral dopaminergic therapies for Parkinson's disease: current treatments and the future. **npj Parkinson's Disease**, v. 2, n. 1, p. 16023, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/npjparkd201623>>.

REINER, A.; ISACOFF, E. Y. Tethered ligands reveal glutamate receptor desensitization depends on subunit occupancy. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 4, p. 273–280, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1458>>.

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

1165, 2016. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27221269>%0A<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5088077>%0A<http://www.cmaj.ca/lookup/doi/10.1503/cmaj.151179>>.

RODRIGUES E SILVA, A. M.; GELDSETZER, F.; HOLDORFF, B.; KIELHORN, F. W.; BALZER-GELDSETZER, M.; OERTEL, W. H.; HURTIG, H.; DODEL, R. Who was the man who discovered the “Lewy bodies”? **Movement Disorders**, v. 25, n. 12, p. 1765–1773, 2010.

RODRIGUEZ, M.; RODRIGUEZ-SABATE, C.; MORALES, I.; SANCHEZ, A.; SABATE, M. Parkinson’s disease as a result of aging. **Ageing Cell**, v. 14, n. 3, p. 293–308, 2015.

ROODVELDT, C.; LABRADOR-GARRIDO, A.; GONZALEZ-REY, E.; LACHAUD, C. C.; GUILLIAMS, T.; FERNANDEZ-MONTESINOS, R.; BENITEZ-RONDAN, A.; ROBLEDO, G.; HMADCHA, A.; DELGADO, M.; DOBSON, C. M.; POZO, D. Preconditioning of microglia by α -synuclein strongly affects the response induced by toll-like receptor (TLR) stimulation. **PLoS ONE**, 2013.

SCHAPIRA, A. H. V.; CHAUDHURI, K. R.; JENNER, P. Non-motor features of Parkinson disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 435–450, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2017.62>>.

SCHAPIRA, A. H. V. Mitochondrial dysfunction in Parkinson’s disease. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 7, p. 1261–1266, 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.cdd.4402160>>.

SCHWAB, C.; MCGEER, P. L. Inflammatory aspects of Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. **Journal of Alzheimer’s disease : JAD**, 2008.

SCHWARTING, R. K. W.; HUSTON, J. P. **Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae** *Progress in Neurobiology*, 1996. .

SCHWARTZ, E. F.; MOURÃO, C. B. F.; MOREIRA, K. G.; CAMARGOS, T. S.; MORTARI, M. R. **Arthropod venoms: a vast arsenal of insecticidal neuropeptides**. *Biopolymers*, 2012. .

SHIMOHAMA, S.; SAWADA, H.; KITAMURA, Y.; TANIGUCHI, T. Disease model: Parkinson's disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 8, p. 360–365, 2003.

SILVA, J.; MONGE-FUENTES, V.; GOMES, F.; LOPES, K.; DOS ANJOS, L.; CAMPOS, G.; ARENAS, C.; BIOLCHI, A.; GONÇALVES, J.; GALANTE, P.; CAMPOS, L.; MORTARI, M. Pharmacological alternatives for the treatment of neurodegenerative disorders: Wasp and bee venoms and their components as new neuroactive tools. **Toxins**, v. 7, n. 8, p. 3179–3209, 2015.

SIQUEIRA CUNHA, A. O.; MORTARI, M. R.; OLIVEIRA, L.; GOMES CAROLINO, R. O.; COUTINHO-NETTO, J.; FERREIRA DOS SANTOS, W. Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on chemically induced seizures and action on GABA and glutamate receptors. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, 2005.

SOFIC, E.; RIEDERER, P.; HEINSEN, H.; BECKMANN, H.; REYNOLDS, G. P.; HEBENSTREIT, G.; YODIM, M. B. H. Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. **Journal of Neural Transmission**, 1988.

SON, D. J.; LEE, J. W.; LEE, Y. H.; SONG, H. S.; LEE, C. K.; HONG, J. T. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 115, n. 2, p. 246–270, 2007.

STEFANIS, L. α -Synuclein in Parkinson's disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2012.

SUBRAMANIAM, S. R.; CHESSELET, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**, 2013.

SZETO, J. Y. Y.; LEWIS, S. J. G. Current Treatment Options for Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease Dementia. **Current neuropharmacology**, v. 14, n. 4, p. 326–38, 2016. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26644155%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4876589>>.

TEIVE, H. A. G. O papel de Charcot na doença de Parkinson. **Arquivos de Neuro-**

Psiquiatria, v. 56, n. 1, p. 141–145, 1998. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X1998000100026&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

VERA DIAS, EUNSUNG JUNN, M. M. M. The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. **J Parkinsons Dis**, v. 3, n. 4, p. 461–491, 2014.

VIVEKANANTHAM, S.; SHAH, S.; DEWJI, R.; DEWJI, A.; KHATRI, C.; OLOGUNDE, R. Neuroinflammation in Parkinson's disease: Role in neurodegeneration and tissue repair. **International Journal of Neuroscience**, v. 125, n. 10, p. 717–725, 2015.

WALUSINSKI, O. Jean-Martin Charcot and Parkinson's disease: Teaching and teaching materials. **Revue Neurologique**, p. 1–15, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neurol.2017.08.005>>.

WANG, Q.; LIU, Y.; ZHOU, J. **Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target** *Translational Neurodegeneration*, 2015. .

WHITWORTH, A. J.; PALLANCK, L. J. PINK1/Parkin mitophagy and neurodegeneration—what do we really know in vivo? **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 44, p. 47–53, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2017.01.016>>.

ZENG, X.-S.; GENG, W.-S.; JIA, J.-J.; CHEN, L.; ZHANG, P.-P. Cellular and molecular basis of neurodegeneration in Parkinson disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 10, n. APR, p. 1–16, 2018.

ZHANG, J.; CULP, M. L.; CRAVER, J. G.; DARLEY-USMAR, V. **Mitochondrial function and autophagy: integrating proteotoxic, redox, and metabolic stress in Parkinson's disease**. [s.l: s.n.]v. 144

ZHANG, W. Aggregated α -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. **The FASEB Journal**, 2005.

ZHU, J.; ZHENG, X. Y.; ZHANG, H. L.; LUO, Q. **Kainic acid-induced neurodegenerative model: Potentials and limitations** *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011. .

Anexos

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



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

Brasília, 18 de agosto de 2014.



DECLARAÇÃO

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


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



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