



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CAIO VINÍCIUS IBIAS BELARDINELLI DE AZEVEDO

Avaliação dos sinais não-motores e da segurança do peptídeo nanoencapsulado Fraternina-10
em um modelo experimental da Doença de Parkinson

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Márcia Renata Mortari

BRASÍLIA

2025

CAIO VINÍCIUS IBIAS BELARDINELLI DE AZEVEDO

Avaliação dos sinais não-motores e da segurança do peptídeo nanoencapsulado Fraternina-10 em um modelo experimental da Doença de Parkinson

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Márcia Renata Mortari (presidente)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Cleiton Lopes Aguar
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Maurício Homem de Mello
Universidade de Brasília

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

*Dedico este trabalho à minha vó Carmen e meu vô Vilmar,
Aos meus pais Cristiane e Demostenes
E ao amor da minha vida Maria Clara*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Márcia Mortari, por ter me apoiado durante todo o processo. Me dando uma oportunidade única de aprender tanto com ela, sei que levarei todos esses ensinamentos pelo resto da vida. Você tornou possível um projeto que existia somente na minha cabeça. Serei eternamente grato por ter tido você como orientadora.

Agradeço à Luana que esteve junto durante tudo, me ajudou em muitos processos fundamentais para o meu mestrado. Obrigado por todo o apoio, por sempre estar disponível para me ajudar e sempre ter acreditado em mim.

Agradeço aos professores que me influenciaram e me inspiraram a ser um cientista melhor, Maurício, Rafael, Cleiton, Lilian.

Agradeço ao Diogo pela companhia no laboratório, por toda a paciência em tirar minhas dúvidas e acima de tudo pela amizade formada nesses últimos 2 anos.

Agradeço a todos os amigos e colegas do departamento de Ciências Fisiológicas: Israel, Jonathan, Manu, Pina, Isaías.

Agradeço aos meus amigos do laboratório Letícia, Rayanne, Isabela, Victoria, Gabriel, Bibi, Rodrigo que me ajudaram sempre que precisei e sempre quebraram a cabeça junto comigo. Pela companhia nos almoços na copa, nos dias longos, nos fins de semanas e nos feriados. Vocês foram responsáveis por tornar esses dois anos muito mais leves.

Agradeço aos estagiários que me ajudaram em momentos que jamais conseguira fazer tudo sozinho e sem eles esse projeto não teria existido, Gabriel, Helena, Gabriely e Anna.

Agradeço as amigas que fiz nesse processo Mariel e Camila, por todas as conversas, saídas e carinho.

Agradeço ao Arthur Dinis, por toda amizade de mais de 10 anos. Me traz muita felicidade que nossa amizade resistiu ao tempo e distância. Obrigado por mesmo longe ter estado lá quando eu precisava desabafar, conversar da vida ou só distrair. Um irmão que a vida me deu.

Agradeço ao Pedro Queiroz, por todos os cafezinhos quando eu não aguentava mais fazer experimento. Pelas cervejinhas nas sextas depois de uma longa semana no mestrado. Por toda a companhia na graduação e no Mestrado.

Agradeço a Ana Luísa e Karol, Ana nos tornamos amigos na graduação e estamos aí até hoje. Obrigado a vocês duas por todos os rolês, shows e companhia sempre.

Agradeço aos meus amigos Amir e Rafinha por todas as conversas sobre futebol, por todas as risadas, pelos momentos de carinho e por todos os bolinhos de bacalhau e belisquetes.

Agradeço aos meus amigos da época do colégio que ainda estão comigo Marina, Gabriela e Pedro. Obrigado pelo companheirismo, carinho e cuidado por todos esses anos.

Agradeço aos meus amigos do curso de biotecnologia, Leonado, Uchoa, Lucas, Carlos, Gasparotto, Erick, Kat, Letícia.

Agradeço aos meus amigos que estão longe Dryele, Mariana e Pedro. Vocês fazem muita falta, saudade de vocês.

Agradeço aos meus cachorros Steve e Chewie, por toda a companhia durante as noites longas que vocês passaram do meu lado.

Agradeço a minha prima Mariana, fico muito feliz que nos aproximamos.

Agradeço a minha vó Carmen e que é uma segunda mãe para mim. Obrigado por todo o amor, por todo o apoio, por todas as atividades de escola, por todo o carinho, por ficar comigo quando eu não conseguia dormir. Nunca serei capaz de expressar o quanto te amo, você é uma das maiores influências da minha vida e serei sempre grato por tudo que você fez por mim.

Agradeço ao meu vô Vilmar que infelizmente não está mais entre nós. O senhor faz muita falta, sinto falta de ver e falar do Corinthians com você. Obrigado por tudo que o senhor fez por mim você foi um segundo pai na minha vida.

Agradeço aos meus pais Cristiane e Demostenes por todos os sacrifícios que fizeram por mim. Vocês me ensinaram a importância da educação e se hoje estou terminando o meu mestrado é por causa de vocês. Obrigado pelo apoio durante toda minha vida e por todos os momentos difíceis, por me ensinarem o valor da resiliência e de nunca desistir. Vocês são minhas maiores inspirações amo vocês.

Por último, agradeço ao amor da minha vida Maria Clara, você foi minha maior apoiadora durante todo mestrado. A melhor coisa desses últimos dois anos foi que eles foram passados do seu lado. Sem você eu não teria conseguido chegar ao fim, obrigado por sempre acreditar em mim. Obrigado por todos os docinhos quando eu estava cansando, pelos almoços

no meio da semana que alegravam meu dia. Obrigado por sempre me trazer alegria e ser a luz do meu dia, você me faz a pessoa mais feliz do mundo. Te amo mais que tudo meu amor.

*“Manda avisar que aqui nós tira água de pedra
Terceiro mundo, fábrica de Marighella”*

Febem, Fleezus e CERSV

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa, que tem como marco histopatológico inicial a perda de neurônios dopaminérgicos na região da Substantia Nigra, afetando cerca de 10 milhões de pessoas ao redor do mundo. Adicionalmente aos sinais motores característicos da doença, existem sinais não-motores que também fazem parte da doença, como as disfunções gastrointestinais, distúrbios do sono, déficits cognitivos, depressão e ansiedade. Dessa forma, a maioria dos sinais não-motores impactam a qualidade de vida em 98% da população que possui a DP, no entanto, os tratamentos utilizados não aliviam ou reduzem esse impacto. Sendo assim, é de suma importância a avaliação dos sinais não-motores quando se estuda o desenvolvimento de novos possíveis tratamentos. A Fraternina-10 apresentou potencial terapêutico para a DP, mas apresentou toxicidade nas doses aplicadas e nenhuma análise para o alívio de sinais não-motores foi realizada. Sendo assim, com o intuito de reduzir a toxicidade e melhorar a biodisponibilidade, foi feita a associação do peptídeo a uma nanopartícula. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi padronizar um modelo com a presença de sinais não-motores, utilizando a neurotoxina 6-OHDA, para que seja avaliada a ação do peptídeo associado a uma nanopartícula, assim como a mudança de efeitos adversos do peptídeo. Após a obtenção, a Nanopartícula apresentou estabilidade em suas características físico-químicas durante um período de 120 dias. Foram testadas 3 doses de Fraternina-10 associadas a nanopartícula (NF-10) (20, 10 e 5 µg/animal) e 3 doses do peptídeo na sua forma livre (20, 10 e 5 µg/animal) em protocolo de toxicidade de dose única. Nesse protocolo de toxicidade de dose única, os tratamentos não demonstraram efeitos adversos, exceto pelo grupo tratado com NF-10 na maior dose de 20 µg/animal. Visando a padronização do modelo não-motor foram testadas duas doses de 6-OHDA 40 e 30 µg/animal, por apresentar mudanças significativas no comportamento do tipo ansioso no teste de labirinto em cruz elevado (LCE), a dose escolhida foi a de 30 µg/animal. Após a padronização da dose de 6-OHDA, foram feitos o teste de LCE para avaliação de comportamento do tipo ansioso, campo aberto, para análise motora e comportamental, e teste de reconhecimento de objeto novo (TRON), para a análise de consolidação de memória de longo prazo. Para os ensaios, foram utilizados os seguintes grupos, veículo, 6-OHDA (30 µg/animal) e NF-10 em sua dose terapêutica (10 µg/animal). O grupo NF-10 apresentou uma melhora em relação ao comportamento do tipo ansioso gerado pela 6-OHDA. Nenhuma diferença motora no campo aberto foi vista entre o grupo 6-OHDA e veículo. No entanto, o grupo NF-10 demonstrou piora motora. No TRON, o grupo 6-OHDA apresentou déficit cognitivo em relação ao grupo veículo, já o grupo do tratamento não apresentou melhora em relação ao grupo 6-OHDA. Os resultados indicam que foi possível replicar sinais não-motores em um modelo de 6-OHDA e que o peptídeo nanoencapsulado reverteu os efeitos reduzindo os comportamentos do tipo ansiosos.

Palavras-chave: Sinais não-motores, Doença de Parkinson, 6-OHDA, peptídeo, toxicidade.

ABSTRACT

Parkinson's Disease (PD) is a neurodegenerative disorder whose initial histopathological hallmark is the loss of dopaminergic neurons in the Substantia Nigra, affecting approximately 10 million people worldwide. In addition to the characteristic motor symptoms of the disease, there are non-motor symptoms that are also part of the condition, such as gastrointestinal dysfunction, sleep disturbances, cognitive deficits, depression, and anxiety. Thus, most non-motor symptoms impact the quality of life of 98% of the PD population; however, current treatments do not alleviate or reduce this impact. Therefore, assessing non-motor symptoms is crucial when studying the development of new potential treatments. Fraternine-10 has shown therapeutic potential for PD, but it exhibited toxicity at the administered doses, and no analysis was conducted regarding its ability to relieve non-motor symptoms. To reduce toxicity and improve bioavailability, the peptide was combined with a nanoparticle. Accordingly, the objective of this study was to standardize a model presenting non-motor symptoms using the neurotoxin 6-OHDA, allowing for the evaluation of the nanoparticle-associated peptide's effects as well as changes in the peptide's adverse effects. After preparation, the nanoparticle maintained stability in its physicochemical characteristics for a period of 120 days. Three doses of nanoparticle-associated Fraternin-10 (NF-10) (20, 10, and 5 $\mu\text{g}/\text{animal}$) and three doses of the free peptide (20, 10, and 5 $\mu\text{g}/\text{animal}$) were tested in a single-dose toxicity protocol. In this protocol, the treatments did not show adverse effects, except for the group treated with NF-10 at the highest dose (20 $\mu\text{g}/\text{animal}$). To standardize the non-motor model, two doses of 6-OHDA (40 and 30 $\mu\text{g}/\text{animal}$) were tested. Since the 30 $\mu\text{g}/\text{animal}$ dose induced significant changes in anxiety-like behavior in the Elevated Plus Maze (EPM) test, it was selected for further studies. After standardizing the 6-OHDA dose, behavioral assessments were conducted, including the EPM test (for anxiety-like behavior), the open field test (for motor and behavioral analysis), and the Novel Object Recognition Test (NORT) (for evaluating long-term memory consolidation). The following groups were used in the experiments: vehicle, 6-OHDA (30 $\mu\text{g}/\text{animal}$), and NF-10 at its therapeutic dose (10 $\mu\text{g}/\text{animal}$). The NF-10 group showed improvement in anxiety-like behavior induced by 6-OHDA. No motor differences were observed between the 6-OHDA and vehicle groups in the open field test. However, the NF-10 group exhibited motor impairment. In the NORT, the 6-OHDA group displayed cognitive deficits compared to the vehicle group, while the treatment group did not show improvement relative to the 6-OHDA group. The results indicate that it was possible to replicate non-motor symptoms in a 6-OHDA model and that the nanoencapsulated peptide reversed some effects, reducing anxiety-like behaviors.

Keywords: Non-motor symptoms, Parkinson's Disease, 6-OHDA, peptide, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Patofisiologia da doença de Parkinson. -25-

Figura 2. Presença de sinais motores e não-motores da doença de Parkinson de acordo com a progressão da doença e seu grau de severidade. Adaptado de Powe et al., 2017. -28-

Figura 3. Sequência dos resíduos de aminoácido, dos peptídeos Fraternina, Fraternina-10 e Exadina-4. Adaptado de Mayer et al., 2024. -36-

Figura 4. Esquema representativo das nanoformulações mais utilizadas e seus diferentes subtipos. Adaptado de Yadav et al., 2025. -38-

Figura 5. Representação imagética da estrutura dos principais tipos de nanopartículas lipídicas. (A) Nanoemulsão Lipídica. (B) Nanocápsula lipídica. (C) Nanopartícula lipídica sólida. (D) Carreador lipídico nanoestruturado. Adaptado de Graván et al., 2023. -40-

Figura 6. Estrutura química das principais neurotoxinas utilizadas em modelos animais. -44-

Figura 7. Linha do tempo do surgimento de novos modelos animais. -45-

Figura 8. Nanoformulações produzidas do tipo nanopartícula lipídica com o núcleo líquido, do tipo nanocápsula. (A) Nanopartícula branca composta somente pela estrutura da nanopartícula sem carrear o peptídeo. (B) Nanopartícula envelopando o peptídeo Fraternina-10. Figura desenvolvida com Biorender. -52-

Figura 9. Processo de formação da nanocapsula. (A) Formulação da nanopartícula branca (NB). (B) Formulação da nanopartícula + Fraternina-10 (NF-10). Figura desenvolvida com Biorender. -55-

Figura 10. Formulação da nanopartícula lipídica líquida, do tipo nanocápsula. Figura desenvolvida com Biorender. -56-

Figura 11. Esquema temporal de formulação, armazenagem e caracterização das nanopartículas. -56-

Figura 12. (A) Cubeta (DTS0012) utilizada na análise de diâmetro hidrodinâmico. (B) Cubeta (DTS1070) utilizada na análise de potencial zeta. (C) protocolo de análise das características físico-químicas no Zetasizer Nano ZS90. Figura desenvolvida com Biorender. -57-

Figura 13. Esquema do protocolo de toxicidade de dose única e testes comportamentais utilizados. Pontos azul representam dias com o desafio no teste do Rotarod, pontos vermelhos representam dias com o teste de campo aberto, ponto rosa representa a eutanásia dos animais. -60-

Figura 14. Imagem do teste do Rotarod utilizado no protocolo de dose única. Figura desenvolvida com Biorender. -61-

Figura 15. Esquema temporal do protocolo de sinais não-motores da DP em camundongos. Dia 0, sendo o dia da cirurgia estereotáxica, dia 1-15 tratamento pela via intranasal, dia 12 teste do Labirinto em cruz elevado, dia 13 o teste do campo aberto, dia 14 habituação do TRON, dia 15 o teste de reconhecimento de objeto e dia 16 a eutanásia dos animais. -66-

Figura 16. Teste do labirinto em cruz elevado, utilizado no protocolo como indicador de comportamentos ansiosos. -67-

Figura 17. Teste do campo aberto quadrado, utilizado no protocolo como indicador de mobilidade. -67-

Figura 18. Teste de reconhecimento de objeto novo utilizado no protocolo como indicador de memória de longo prazo. Habituação ao objeto familiar e 24 horas depois um dos objetos é trocado por um objeto novo. -68-

Figura 19. Diâmetro hidrodinâmico em nanômetros medido com a técnica de espalhamento dinâmico de luz utilizando o instrumento Zetasizer Nano ZS90, a medição foi feita nos seguintes dias, 1, 7, 15, 30, 60, 90 e 120. Os testes estatísticos utilizados foram ANOVA de duas vias e pós teste de comparações múltiplas de Tukey. (****) equivale $p < 0.0001$ em relação a nanopartícula branca (NB) no mesmo dia de análise da nanopartícula acoplada a Fraternina-10 (NF-10). Sendo assim, a diferença encontrada é comparando as nanoformulações em seus respectivos dias de medição, ou seja, NB e NF-10 do dia 1, NB e NF-10 do dia 7 e assim por diante. -71-

Figura 20. O índice de polidispersão (PDI) foi medido nos dias 1, 7, 15, 30, 60, 90 e 120 por meio do instrumento Zetasizer Nano ZS90. Foram testadas duas nanoformulações, nanopartícula branca (NB) e nanopartícula envelopando o peptídeo Fraternina-10 (NF-10). A análise estatística feita foi uma ANOVA de duas vias e um teste de TUKEY como análise múltipla. -72-

Figura 21. Potencial Zeta (PZ) foi medido com o Zetasizer Nano ZS90 nos dias 1, 7, 15, 30, 60, 90, 120. Duas nanoformulações foram testadas, nanopartícula branca (NB) e o peptídeo Fraternina-10 envelopado pela nanopartícula (NF-10). ANOVA de duas vias foi a análise estatística utilizada, em seguida, o teste de Tukey como comparação múltipla. -73-

Figura 22. Potencial hidrogeniônico foi medido nos dias 1, 7, 15, 30, 60, 90 e 1200. Duas nanoformulações foram usadas, nanopartícula branca (NB) e nanopartícula envelopando o peptídeo Fraternina-10 (NF-10). Anova de duas vias foi a análise utilizada. -74-

Figura 23. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da nanopartícula branca (NB) em aumento de 20.000 vezes. -75-

Figura 24. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da nanopartícula encapsulando o peptídeo Fraternina-10 (NF-10) em aumento de 20.000 vezes. -75-

Figura 25. Latência para a queda no teste de cilindro rotatório em segundos. Dias de teste se encontram no eixo x pré-teste (PT), dia 1 (D1) e dia 14 (D14), composta pelos grupos salina, Nanopartícula branco (NB), Nanopartícula + Fraternina-10 (NF-10) (5, 10 e 20 ug/animal), Fraternina-10 (Fra-10) (5, 10 e 20 ug/animal). A análise estatística realizada foi ANOVA de duas vias e comparação múltipla utilizando o teste Tukey. (****) equivale a $p < 0.0001$ em relação ao PT. (&) equivale a $p < 0.05$ em relação ao D1. -76-

Figura 26. Variação de massa ao longo do período de 14 dias. Os grupos presentes foram, Nanopartícula branco (NB), Nanopartícula + Fraternina-10 (NF-10) (5, 10 e 20 ug/animal), Fraternina-10 (Fra-10) (5, 10 e 20 ug/animal). A análise estatística realizada foi ANOVA de duas vias e uma análise pós de comparação múltipla por meio do teste de Tukey. -77-

Figura 27. Análise histopatológica dos rins com corte 50 (μm), imagens com aumento 10x. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos. (A) grupo salina; (B) grupo NB; (C) grupo

NF-10 5 µg/animal; (D) NF-10 10 µg/animal; (E) NF-10 20 µg/animal (F) Fra-10 5 µg/animal; (G) Fra-10 10 µg/animal; (H) Fra-10 20 µg/animal. -78-

Figura 28. Análise histopatológica dos pulmões com corte 50 (µm), imagens com aumento 10x. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos. (A) grupo salina; (B) grupo NB; (C) grupo NF-10 5 µg/animal; (D) NF-10 10 µg/animal; (E) NF-10 20 µg/animal (F) Fra-10 5 µg/animal; (G) Fra-10 10 µg/animal; (H) Fra-10 20 µg/animal. -79-

Figura 29. Análise histopatológica dos fígados com corte 50 (µm), imagens com aumento 10x. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos. (A) grupo salina; (B) grupo NB; (C) grupo NF-10 5 µg/animal; (D) NF-10 10 µg/animal; (E) NF-10 20 µg/animal (F) Fra-10 5 µg/animal; (G) Fra-10 10 µg/animal; (H) Fra-10 20 µg/animal. -80-

Figura 30. Análise de comportamentos do tipo ansioso no aparato de labirinto em cruz elevado. Os grupos presentes foram veículo, dois grupos com doses distintas de 6-OHDA 40 ug/animal e 30 ug/animal. A análise estatística realizada foi a ANOVA de duas vias, seguido por o teste de Tukey de comparação múltipla. (**) equivale a $p < 0.01$ em relação ao braço fechado do grupo veículo. (&&&) equivale a $p < 0.0005$ em relação ao braço fechado do grupo 40 ug/animal. (##) representa $p < 0.01$ em relação ao grupo veículo no braço aberto. (\$\$\$) representa $p < 0.0005$ em relação ao grupo 40 ug/animal de 6-OHDA no braço aberto. -82-

Figura 31. Teste de labirinto em cruz elevado utilizado como indicador de ansiedade. Foram comparados a porcentagem de tempo passada em cada tipo de braço (aberto e fechado). Três grupos de tratamentos veículo, 6-OHDA e Fraternina-10 envelopada pela nanopartícula (10 ug/animal) (NF-10). Análise estatística realizada foi a ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey de comparação múltipla. (****) representa $p < 0.0001$, (**) representa $p < 0.01$, em relação ao grupo veículo nos braços fechados. (#####) representa $p < 0.0001$, (##) representa $p < 0.001$, em relação ao grupo veículo nos braços abertos. (&) representa $p < 0.05$ em relação ao grupo 6-OHDA nos braços fechados. (\$) representa $p < 0.05$ em relação ao grupo 6-OHDA nos braços abertos. -83-

Figura 32. Parâmetros do teste do campo aberto, analisando aspectos motores. Os grupos presentes no teste foram veículo, 6-OHDA e Fraternina-10 envelopada pela nanopartícula (NF-10). A análise estatística realizada foi a ANOVA de duas vias, seguida por uma comparação múltipla com o teste de Tukey. (A) distância percorrida total pelo animal em metros. (B) tempo

total passado imóvel em segundos pelos animais. (C) Velocidade média dos animais em metros por segundo. Teste estatístico realizado foi (**) equivale a $p < 0.01$, (*) equivale a $p < 0.05$ em relação ao grupo veículo. (&) equivale a $p < 0.05$ em relação ao grupo 6-OHDA. **-84-**

Figura 33. Teste de Reconhecimento de Objeto Novo foi feito visando avaliar memória de longo prazo. O único grupo de animais saudáveis foi usado. A comparação foi feita entre a porcentagem de tempo explorando cada objeto, o familiar e o novo. A análise estatística utilizada foi um teste T não pareado. (***) equivale a $p < 0.0005$ em relação ao objeto familiar. **-85-**

Figura 34. Avaliação do efeito terapêutico do peptídeo envelopado por uma nanopartícula por meio do Teste de Reconhecimento de Objeto Novo. Os grupos presentes foram veículo, 6-OHDA, e Fraternina-10 envelopada pela nanopartícula (NF-10). A análise estatística realizada foi a ANOVA de duas vias, seguida por uma comparação múltipla com o teste de Tukey. (*) equivale a $p < 0.05$ em relação a porcentagem de exploração do objeto novo do grupo veículo. (&) equivale a $p < 0.05$ em relação a porcentagem de exploração do objeto familiar do grupo veículo. **-86-**

Figura 35. Avaliação da neurodegeneração por meio da contagem de neurônios TH+. A análise foi entre o lado contralateral (sadio) e lado ipsilateral (lesionado), a análise estatística foi um teste t não pareado. (***) equivale a $p < 0.0005$ em relação ao lado ipsilateral. **-87-**

Figura 36. Contagem de neurônios de TH+ nos lados contralateral (sem lesão) e ipsilateral (lesionado). A marcação de TH representa neurônios dopaminaérgicos, já a do DAPI marca o núcleo dos neurônios. **-88-**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais sintomas não-motores que afetam pacientes com DP.

Tabela 2 - Aspectos da Doença de Parkinson que cada modelo animal é capaz de reproduzir.

Tabela 3 - Sintomas motores e não-motores que cada modelo é capaz de replicar.

Tabela 4 - Composição das nanoformulações produzidas.

Tabela 5 - Grupos experimentais do protocolo de toxicidade.

Tabela 6 - Grupos experimentais do protocolo de sinais não-motores em um modelo da DP em camundongos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAV vírus adeno associado
BHE Barreira Hematoencefálica
CL Corpus de Lewy
CCL comprometimento cognitivo leve
CLN carreador lipídico nanoestruturado CLN
COMT Catecol O-Metiltransferase
DBS *Deep Brain stimulation*
DCL demência com corpos de Lewy
DDP demência na doença de Parkinson
DP Doença de Parkinson
DSC declínio subjetivo cognitivo
EEG eletroencefalograma EEG
EROs espécies reativas de oxigênio
Fra-10 fraternina-10
LCE Levodopa/carbidopa/entacapona
LCE Labirinto em cruz elevado
L-Dopa Levodopa
MAO-B inibidores monoamina oxidase B
MDS *International Parkinson and Movement Disorder Society*
MPP+ 1-metil-4-fenilpiridínio
MPTP 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NCL nanocápsula lipídica
NEL nanoemulsão lipídica
NLL nanopartícula lipídica líquida
NLS nanopartícula lipídica sólida
NREM não REM
OF campo aberto
PFFs fibrilas pré-formadas
REM movimento rápido dos olhos
SDD sonolência durante o dia
SN Substantia Nigra

SNC Sistema Nervoso Central

SNCA gene alfa-sinucleína

SNPC Substantia nigra pars compacta

TNF- α fator de necrose tumoral alfa

TRON teste de reconhecimento de objeto novo

6-OHDA 6-Hidroxidopamina

Lista de Abreviatura dos Aminoácidos

Nome	Símbolo	Abreviatura
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Cisteína	Cys	C
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V
Ácido piroglutâmico	Pyr	-

SUMÁRIO

SUMÁRIO	19
1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. Doença de Parkinson	21
1.1.1. Propedêutica e epidemiologia	21
1.1.2. Patofisiologia da DP	23
1.1.3. DP e seus sinais não-motores	26
1.1.3.1. Prevalência dos sinais	26
1.1.3.2. Distúrbios no Sono da DP	28
1.1.3.3. Impacto da Memória na DP	29
1.1.3.4. Ansiedade e depressão na DP	31
1.1.4. Tratamentos disponíveis para a doença de Parkinson	32
1.1.4.1. Levodopa.....	33
1.1.4.2. Outros tratamentos disponíveis.....	33
1.1.4.3. Medicamentos visando a melhora de sinais não-motores	35
1.1.4.4. Peptídeos Terapêuticos para a DP	35
1.2. Nanotecnologia no tratamento de Parkinson	37
1.2.1. Tipos de nanopartículas.....	38
1.3. Modelos pré-clínicos da DP.....	42
1.3.1. Principais modelos empregados	42
2. OBJETIVOS	51
2.1. Objetivos gerais	51
2.2. Objetivos específicos	51
3. METODOLOGIA.....	52
3.1. Nanopartícula	52
3.1.1. Produção da nanopartícula.....	52
3.1.2. Análise Físico-Química	55
3.2. Sujeitos experimentais e aspectos éticos	57
3.3. Análise Toxicológica	57
3.3.1. Protocolo	57
3.3.2. Ensaio comportamentais	59
3.3.3. Eutanásia, coleta e armazenamento dos órgãos	60
3.3.4. Histologia	61
3.4. Sinais não-motores no modelo de DP em camundongos.....	62
3.4.1. Padronização do modelo	62
3.4.2. Neurocirurgia	62
3.4.3. Padronização da dose da neurotoxina	63
3.4.4. Protocolo experimental de 15 dias	63
3.4.5. Testes Comportamentais	65
3.4.5.1. Labirinto em Cruz Elevado	65
3.4.5.2. Teste do campo aberto – Open Field	66
3.4.5.3. Análise de déficits cognitivos pelo TRON	67
3.4.5.4. Eutanásia, perfusão transcardíaca e retina dos encéfalos	67
3.4.5.5. Imuno-histoquímica	68

4. RESULTADOS.....	70
4.1. Nanoformulação	70
4.1.1. Diâmetro Hidrodinâmico	70
4.1.2. Índice de Polidispersão	71
4.1.3. Potencial Zeta	72
4.1.4. Potencial Hidrogeniônico	73
4.1.5. Análise das nanoformulações por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	74
4.2. Ensaios Biológicos: Avaliação da Toxicidade do peptídeo livre e da nanoformulação	76
4.2.1. Teste de desequilíbrio motor - Rotarod	76
4.2.2. Avaliação da massa corporal dos animais.....	77
4.2.3. Avaliação Histológica dos órgãos.....	78
4.3. Avaliação dos sinais não-motores no modelo de 6-OHDA	82
4.3.1. Comportamentos do tipo de ansiosos avaliados no LCE	82
4.3.1.1. Determinação da dose de 6-OHDA	82
4.3.1.2. Avaliação terapêutica	83
4.3.2. Avaliação dos comportamentos espontâneos no teste do campo aberto - Open Field.....	84
4.3.3. Avaliação da memória utilizando o Teste de Reconhecimento de Objeto Novo (TRON)	86
4.3.3.1. Padronização do TRON	86
4.3.3.2. Avaliação Terapêutica	87
4.3.4. Avaliação por imuno-histoquímica	88
5. DISCUSSÃO	91
6. CONCLUSÃO.....	97
7. REFERÊNCIAS	98
ANEXOS	125
Anexo A: Cromatograma da Fraternina-10.....	125
Anexo B: Aprovação comitê de ética.....	125
Anexo C: Aprovação comitê de ética	126

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Parkinson

1.1.1. Propedêutica e epidemiologia

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa, segunda mais prevalente no mundo, impactando 3% da comunidade idosa (ZHANG *et al.*, 2024) atrás somente da Doença de Alzheimer. Além disso, é a doença neurológica que mais cresce no mundo (Dorsey 2018).

Em 2019, cerca de 8,5 milhões de pessoas tinham a DP no mundo. De 1990 até 2019, a doença passou por um aumento de prevalência em 155% (FEIGIN *et al.*, 2019). Desde o começo do século XXI, há entre 5 e 35 novos casos por 100.000 indivíduos a cada ano (TWELVES; PERKINS; COUNSELL, 2003). Casos de DP até os 50 anos de idade são muito raros, mas a partir dos 60 até os 90 anos, o risco aumenta de 5 a 10 vezes (POEWE *et al.*, 2017). Levando em consideração o envelhecimento da população, a DP vem ganhando cada vez mais importância em termos de busca de tratamentos e diagnósticos mais eficazes. Os tratamentos disponíveis têm tido efeitos positivos na longevidade da vida dos pacientes, tendo um aumento na expectativa de vida dos pacientes (LIX *et al.*, 2010).

Descrita pela primeira vez por James Parkinson no “Essay of the shaking Plasy” em 1817, a maioria das observações clínicas feitas por ele resistiram ao tempo e seguem corretas até hoje (POEWE *et al.*, 2017). Apesar ter sido descrita pela primeira vez há mais de 200 anos, muitos aspectos da doença ainda não são compreendidos. Além disso, o diagnóstico pode ser confirmado somente por meio de autópsia post-mortem. Tanto a manifestação clínica quanto a progressão da doença são heterogêneas, sendo muito particular de paciente para paciente (Hayes 2019). Isso pôde ser observado em um estudo que acompanhou pacientes recém diagnosticados e, 10 anos depois, 55% deles haviam morrido, 68% tinham instabilidade postural, 46% sofriam com demência e 23% não tinha nenhum dos dois sinais cardinais (WILLIAMS-GRAY *et al.*, 2013).

A prevalência da DP exibe uma discrepância em relação aos sexos, sendo o dobro no sexo masculino que no sexo feminino (BALDERESCHI *et al.*, 2000; WOOTEN *et al.*, 2004). Além disso, a razão de mortalidade por DP do sexo masculino é maior em relação feminino.

Um estudo relatou aumento da incidência de casos no sexo masculino em intervalos de mais ou menos 10 anos, 1976, 1985, 1996 e 2005. Já para o sexo feminino, a incidência se manteve estável por todo período (SAVICA *et al.*, 2016). Existem muitas hipóteses do porquê dessa diferença, sendo o efeito neuroprotetor de hormônios femininos e questões ambientais os principais fatores elencados. Sendo assim, estudos analisando sexo, raça, etnia e influências ambientais visam buscar uma resposta para essas diferenças. Em relação a casos hereditários, eles representam uma parcela pequena dos pacientes de DP, com somente 5% – 10% dos casos (POEWE *et al.*, 2017). Nesse sentido, podem ocorrer mutações em genes que são associados a DP em pessoas acima de 50 anos.

A DP é caracterizada pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos na *substantia nigra* e pelo acúmulo intracelular da proteína alfa-sinucleína. A principal via dopaminérgica acometida na DP é composta por neurônios que se projetam da *substantia nigra* ao estriado, área associada ao sistema motor. Na fase inicial da doença, a degeneração ocorre majoritariamente somente na área ventrolateral da *substantia nigra*, preservando os neurônios dopaminérgicos no resto do mesencéfalo (DAMIER *et al.*, 1999). A perda desses neurônios por morte celular leva à baixa de dopamina no estriado (TANSEY *et al.*, 2022), desbalanceando sinalizações excitatórias e inibitórias necessárias para uma movimentação normal. Sendo assim, a via nigroestriatal é a maior responsável pelos sinais motores da DP (KUMAR *et al.*, 2024).

A perda de neurônios dopaminérgicos na região do mesencéfalo leva aos sinais motores da DP como bradicinesia, tremor de repouso, instabilidade postural e rigidez postural (RAJ *et al.*, 2021). Ademais, a perda desses neurônios se inicia antes do diagnóstico da DP, que ocorre somente com surgimento dos sinais motores e perda considerável dessa região (DIJKSTRA *et al.*, 2014). A bradicinesia, o tremor de repouso e a rigidez são os três sinais utilizados no diagnóstico. A bradicinesia é caracterizada pela lentidão dos movimentos e amplitude ou velocidade prejudicadas em movimentos contínuos. Os tremores de repouso dizem respeito a tremores entre 4 e 6 Hertz em membros que estão em repouso total, sendo que os tremores são interrompidos por movimentos voluntários. Por último, a rigidez é definida por movimentos passivos lentos nas articulações maiores feitos pelo examinador enquanto o paciente está completamente relaxado (POSTUMA *et al.*, 2015).

A degeneração de neurônios dopaminérgicos também afeta funções não motoras, uma vez que a via dopaminérgica também é responsável por regular o humor, a cognição e as funções autonômicas (JING *et al.*, 2022). No entanto, a patofisiologia em relação aos sinais não-

motores é muita menos elucidada. Em um diagnóstico de DP, o paciente pode apresentar sinais predominantemente motores ou não-motores. Existe uma possível correlação entre uma predominância dos não-motores em um quadro de DP com disfunções nas vias noradrenérgicas, podendo afetar distúrbios no sono, desordens de humor, dor e disautonomia (RAY CHAUDHURI *et al.*, 2023). Além disso, a DP pode apresentar também disfunções nas vias glutamatérgicas, colinérgicas e serotoninérgicas (POEWE *et al.*, 2017).

Apesar de grandes avanços terem sido feitos, elucidando aspectos envolvendo os mecanismos celulares e moleculares da DP, muitos permanecem sem resposta, principalmente em relação à progressão da doença. Dessa forma, essas ausências de informação junto à heterogeneidade da doença dificultam a identificação de biomarcadores, mantendo a dependência do diagnóstico aos sinais motores (PICCA *et al.*, 2021).

1.1.2. Patofisiologia da DP

Como já mencionado, a neurodegeneração ocorre com o passar dos anos nos pacientes da DP. Nesse sentido, muitos fatores contribuem para a neurodegeneração na DP, como a formação de corpos de Lewy, estresse oxidativo, neuroinflamação e disfunção mitocondrial (MORRIS *et al.*, 2024; TONG, 2024). Dessa forma, apesar do impacto de cada uma dessas questões ainda não serem totalmente esclarecidas, muito já se sabe sobre sua influência na DP.

Um marcador patológico central da doença é a presença dos corpos de Lewy (CL) — inclusões citoplasmáticas eosinofílicas compostas principalmente pela proteína α -sinucleína mal conformada — que se acumulam nos neurônios afetados e contribuem para a disfunção celular e morte neuronal. Esses CL não se restringem ao sistema motor, podendo também estar presentes em regiões corticais e do tronco encefálico, o que ajuda a explicar os sintomas não-motores da doença, como alterações cognitivas, distúrbios do sono, depressão e disfunções autonômicas. A alfa-sinucleína é uma proteína com 140 resíduos de aminoácidos codificada pelo gene SNCA. Ela está presente em grandes quantidades no encéfalo, sendo importante na função sináptica e liberação de neurotransmissores (DAS *et al.*, 2022). A função neuronal da proteína ainda não é completamente compreendida, mas sabe-se que ela se liga às vesículas sinápticas e está envolvida na liberação de neurotransmissores e funcionamento mitocondrial (SHARMA; BURRÉ, 2023). Em sua forma natural, ela tende a ter uma estrutura monomérica, porém a conformação presente nos CL possui uma alteração em seu enovelamento em um filamento que as tornam suscetíveis à agregação. Além disso, o acúmulo da proteína pré-

sináptica alfa-sinucleína leva à formação de fibrilas intracelulares insolúveis, levando à formação de aglomerados de alfa-sinucleína, gerando os CL. Esses agregados prejudicam funções celulares e contribuem para a morte de neurônios (NEUPANE; DE CECCO; AGUZZI, 2023). Nesse sentido, o acúmulo começa tipicamente no tronco cerebral e no bulbo olfatório, o que pode explicar o fato do surgimento de alguns sinais não-motores serem anteriores aos sinais motores (BRAAK *et al.*, 2003).

Mutações no gene SNCA causam má formação proteica, enovelamento errôneo e oligomerização (Naren 2023). Essas mutações são a primeira alteração genética identificada e vinculada à DP familiar (POLYMERPOULOS *et al.*, 1997). Além disso, mutações no N-terminal provocam aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e mudam a permeabilidade da membrana mitocondrial (MCGLINCHEY *et al.*, 2021). Dessa forma, com o acúmulo de alfa-sinucleína dentro das mitocôndrias, ocorre a formação de oligômeros tóxicos que levam ao seu mau funcionamento (NAREN *et al.*, 2023). Isso ocorre devido ao efeito inibitório de alfa-sinucleínas malformadas e à acumulação de toxinas no complexo 1 (DEVI *et al.*, 2008). Nesse sentido, a ocorrência de disfunção mitocondrial é um dos principais responsáveis pela neurodegeneração encontrada na DP.

No fim do século XX e começo do XXI, as primeiras mutações ligadas a DP foram observadas, os genes parkin (PARK2) (KITADA *et al.*, 1998) e PINK1 (PARK6) (VALENTE *et al.*, 2004). No entanto, o impacto dessas mutações na DP foi descrito somente uma década depois, mostrando ter um papel importante em ativar e selecionar o processo de autofagia das mitocôndrias, a mitofagia (NARENDRA *et al.*, 2010). A mutação no gene parkin é a mais encontrada em casos precoces da DP, além disso representa entre 50-20% dos casos hereditários de DP (CHIA; TAN; CHAO, 2020).

Quando a mitocôndria se encontra despolarizada, a PINK1 se liga ao lado exterior da sua membrana e fosforila uma ubiquitina presente na membrana. Isso ativa o recrutamento da parkin, que então se liga à PINK1 e, após uma cascata metabólica, sinaliza para a autofagia da mitocôndria (MALPARTIDA *et al.*, 2021). Além disso, mutações no gene LRRK2 também estão ligadas a disfunções mitocondriais, mas os mecanismos por trás ainda não estão elucidados (NAREN *et al.*, 2023). Sendo assim, a desregulação dessas proteínas contribui para a neurodegeneração encontrada na DP.

Outro aspecto que também está interligado e contribui para a neurodegeneração é a neuroinflamação. A *substantia nigra* é uma região do cérebro com alta concentração de

micróglia, sendo muito vulnerável a ataques inflamatórios (KIM *et al.*, 2000). Na década de noventa, foi a primeira vez que foi observada uma ligação entre neuroinflamação e a DP. Foram observadas a presença de interleucinas (BLUM-DEGENA *et al.*, 1995) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (MOGI *et al.*, 1994) em pacientes de DP. Além disso, foram feitos estudos *post mortem* com neuroimageamento e biomarcadores que demonstraram que a neuroinflamação é um fator importante para a DP (MOEHLE; WEST, 2015). Em um estudo, foi encontrada uma alta concentração de células T reativas a alfa-sinucleína em um paciente recém diagnosticado. Quando comparada com a concentração de 10 anos antes, foi encontrada a mesma concentração de 10 anos atrás. Dessa forma, sendo um resultado condizente com a patologia da doença que começa por volta de 10 anos antes do diagnóstico. Adicionalmente, a concentração foi decaindo com o passar dos anos, indicando que células T podem estar ligadas à formação dos oligômeros de alfa-sinucleína (LINDESTAM ARLEHAMN *et al.*, 2020).

Em relação à processos inflamatórios nas mitocôndrias, estes são responsáveis pelo apoptose de células com funcionamento anormal. Dessa forma, a formação de EROs leva à apoptose e a sinalização de proteínas com mutações no gene levam à mitofagia, que inevitavelmente leva à morte celular (PICCA *et al.*, 2021)(Figura 1).

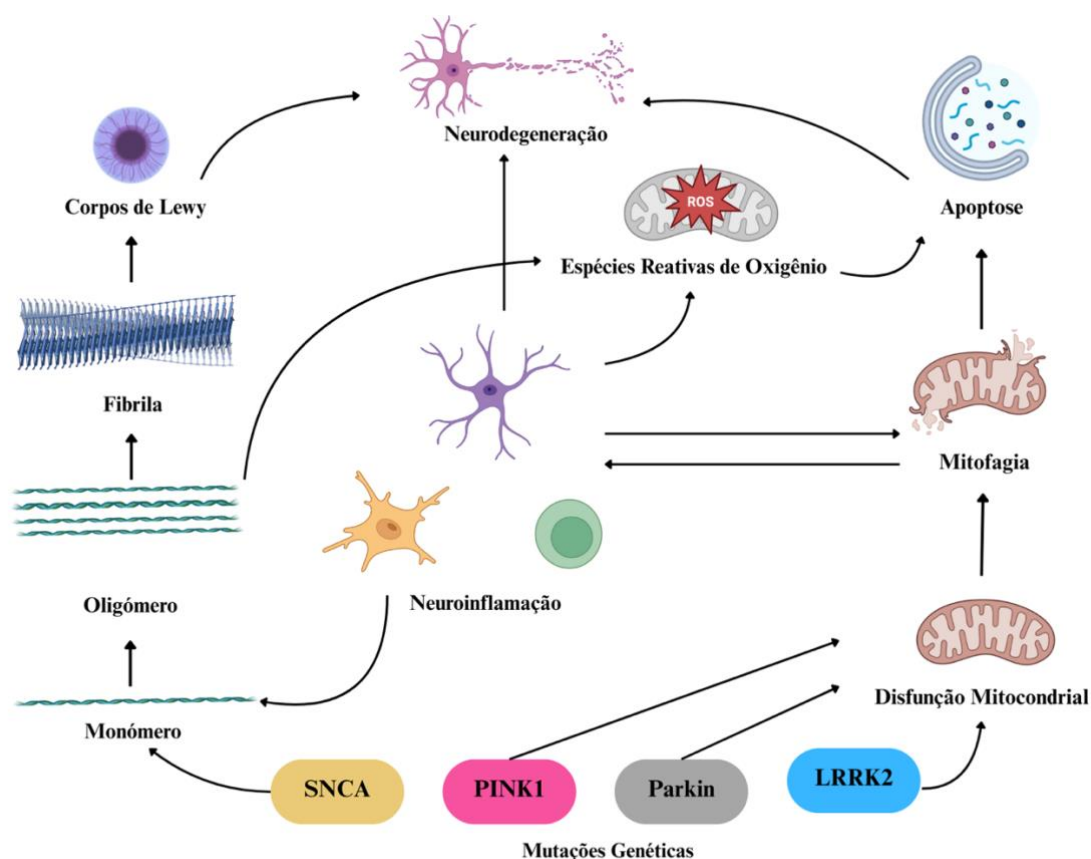


Figura 1. Esquema representativo dos fatores patofisiológicos da Doença de Parkinson. Adaptado de Picca et al., 2021.

1.1.3. DP e seus sinais não-motores

1.1.3.1. Prevalência dos sinais

A doença de Parkinson sempre foi pensada como uma doença motora, desde que foi descrita por James Parkinson (ZAHED *et al.*, 2021). Apesar dos sinais não-motores terem sido descritos pela primeira vez pelo próprio James Parkinson em 1817 (MCDONALD *et al.*, 2018), somente nos últimos anos eles veem ganhando maior notoriedade. Adicionalmente aos sinais motores, sinais não-motores também requerem atenção, tendo em vista que cerca de 98% dos pacientes com DP experienciam pelo menos um sinal não-motor (KRISHNAN *et al.*, 2011).

Os principais sinais não-motores que impactam os pacientes são alterações de olfato (90% dos pacientes apresentam esse sinal da doença) (BOHNEN *et al.*, 2008), distúrbios de sono (65%) (JANZ *et al.*, 2024), déficits cognitivos (80%) (HELY *et al.*, 2008a), disfunções gastrointestinais (80-90%) (KNUDSEN *et al.*, 2017; SUNG; PARK; KIM, 2014), visão prejudicada (78%) (ARCHIBALD *et al.*, 2011), disfunções urinárias (35-79%) (GOLDMAN, 2025; JANZ *et al.*, 2024), dor (30-85%) (JANZ *et al.*, 2024; NÈGRE-PAGÈS *et al.*, 2008), fadiga (62%) (JANZ *et al.*, 2024), ansiedade e depressão (30-50%) (BROEN *et al.*, 2016; MARRAS *et al.*, 2024) (Tabela 1). O surgimento dos primeiros sinais não-motores ocorre anteriormente aos sinais motores em pacientes portadores da DP (Figura 2). No entanto, o diagnóstico da doença ocorre somente por meio dos sinais motores, não existindo nenhuma forma de identificar a doença, antes da fase motora (BEN-SHLOMO *et al.*, 2024). Isso porque os sinais anteriores são considerados não específicos, como os distúrbios de sono, hiposmia, constipação, ansiedade e depressão (Figura 2) (ARMSTRONG; OKUN, 2020).

Dessa forma, existe um período de 10 anos entre o começo da doença e seu diagnóstico (BLOEM; OKUN; KLEIN, 2021), essa é a fase prodômica da DP (MULEIRO ALVAREZ *et al.*, 2024). Uma das teorias que busca explicar a manifestação anterior dos sinais não-motores é o surgimento dos acúmulos de alfa-sinucleína, que se iniciam no bulbo olfatório no SNC, nas áreas periféricas do sistema nervoso e no trato gastrointestinal (SHARMA; BURRÉ, 2023).

Levando isso em consideração, esse diagnóstico tardio prejudica profundamente a qualidade de vida dos pacientes já que sinais motores são aparentes somente quando a degeneração dopaminérgica está entre 60 e 80% (SHARMA; BURRÉ, 2023).. Nesse sentido, isso é um desafio quando se trata de tratamentos e preservação da qualidade de vida do paciente, já que o paciente procura auxílio profissional em uma situação já avançada.

Tabela 1. Principais sinais não-motores que afetam pacientes com DP

Sinais não-motores

Sono	Comportamento	Cognitivo	Sensorial	Funções Autonômicas
• Distúrbios de sono REM • Sonolência diurna • Insônia • Disrupção circadiana	• Psicose • Fadiga • Apatia • Ansiedade • Depressão • Crise de pânico	• Declínio subjetivo cognitivo • Comprometimento cognitivo leve • Demência	• Hiposmia • Visão • Dor	• Cardiovascular • Disfunções Gastrointestinais • Disfagia • Babar • Incontinencia urinária • Disfunção sexual

Buscando uma melhor avaliação de sinais não-motores e da progressão da doença nos pacientes, foram desenvolvidas escalas avaliativas. Uma delas é a NMS Quest (CHAUDHURI *et al.*, 2006), que é composta por 30 perguntas de sim ou não respondidas pelo paciente. A NMS Scale (CHAUDHURI; MARTINEZ-MARTIN, 2008) também possui 30 perguntas de sim ou não, porém ela é do ponto de vista do médico avaliando a severidade e a frequência dos sinais em 9 áreas diferentes. Ambas são as escalas mais utilizadas para avaliação de sinais não-motores na DP.

As questões não motoras da DP reduzem a qualidade de vida tanto dos pacientes quanto dos cuidadores. Ademais, aumentam o gasto em tratamentos (HAGELL *et al.*, 2002), o estresse dos cuidadores e a taxa de internação (MARTINEZ-MARTIN *et al.*, 2011). Além disso, o impacto financeiro na sociedade também é significativo, já que aumenta a população em casas de repouso e acarreta em aposentadorias forçadas (CHAUDHURI; YATES; MARTINEZ-

MARTIN, 2005). Pacientes possuem em média oito vezes mais sinais não-motores em comparação com pessoas da mesma idade (KHOO *et al.*, 2013).

Diferenças de sexo também são observadas quando se trata de sinais não-motores. Pessoas do sexo feminino experenciam mais distúrbios de humor, principalmente ansiedade e depressão (MAAS *et al.*, 2024; MARTINEZ-MARTIN *et al.*, 2012), já pessoas do sexo masculino sofrem mais com as disfunções sexuais, principalmente a disfunção erétil e a hipersexualidade (MARTINEZ-MARTIN *et al.*, 2012; SANTOS-GARCÍA *et al.*, 2023).

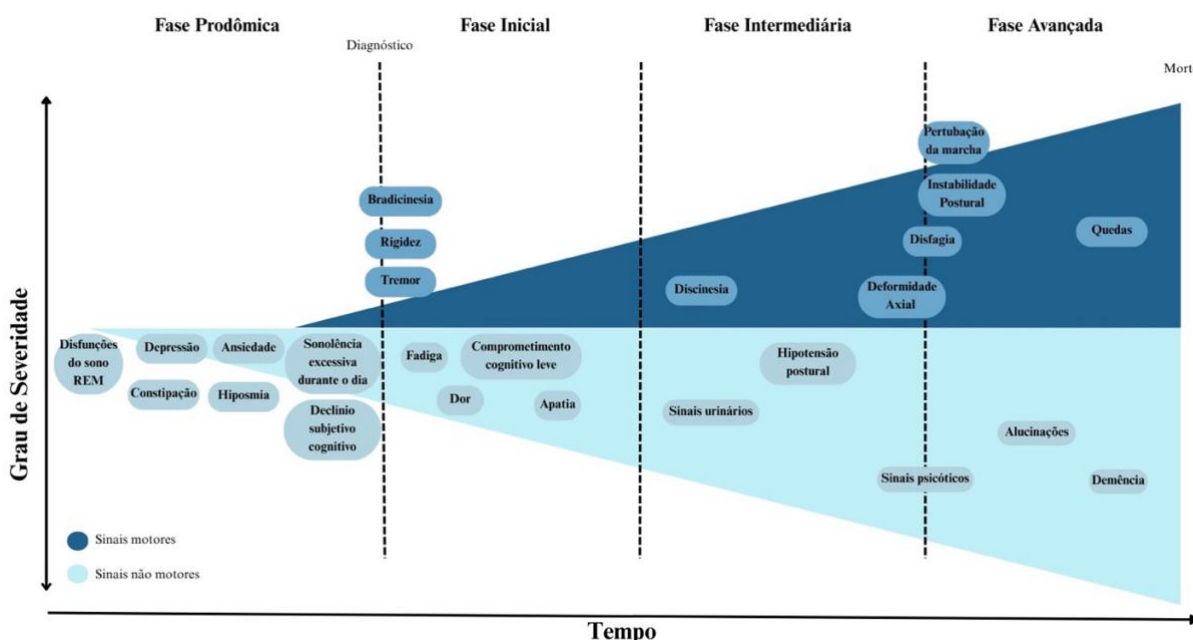


Figura 2. Presença de sinais motores e não-motores da doença de Parkinson de acordo com a progressão da doença e seu grau de severidade. Adaptado de Poewe *et al.*, 2017.

1.1.3.2. Distúrbios no Sono da DP

Distúrbios do sono na DP afetam por volta de 65% dos pacientes. Os principais sinais incluem insônia, transtorno do movimento periódico dos membros, distúrbios de sono com movimento rápido dos olhos (REM), sonolência durante o dia (SDD) e dificuldade para respirar dormindo (BARONE *et al.*, 2009; JANZ *et al.*, 2024). Ademais, muitos distúrbios do sono passam despercebidos, pois cerca de 30% dos pacientes não relatam para os seus servidores médicos suas complicações com sono (HURT *et al.*, 2019), um estudo aponta uma taxa superior a 40% das alterações no sono (CHAUDHURI *et al.*, 2006).

O sinal mais comum em pacientes é a insônia, estando presente em 55 – 65% (GJERSTAD *et al.*, 2007; JANZ *et al.*, 2024). Não existe um consenso para o período que ela surge durante a doença, alguns ligam ao parkinsonismo e as patologias cerebrais (ERRO *et al.*, 2013), já outros remetem ao início de tratamentos dopaminérgicos e a presença de sinais de depressão (ZHANG *et al.*, 2014). A eszopiclona e a melatonina se mostram como possíveis tratamentos para insônia em pacientes de DP (SEPPI *et al.*, 2019).

A SDD é definida como a dificuldade de se manter acordado durante o dia, levando a letargia e sonos repentinos (SATEIA, 2014). Ela é observada no dobro de pacientes de DP em relação aos controles (SUZUKI *et al.*, 2017). A porcentagem de quantos pacientes que possuem SDD varia bastante sem uma taxa precisa, variando entre 20-75% (GROS; VIDENOVIC, 2020). O sinal foi observado em 50% de pacientes em um estudo com 200 pessoas pertencentes ao estudo Sweedish Parkinson registry (JANZ *et al.*, 2024).

1.1.3.3. Impacto da Memória na DP

Problemas cognitivos tendem a ser comuns em pacientes com a DP, sendo 6 vezes mais comuns em comparação com pessoas saudáveis (AARSLAND *et al.*, 2001). Questões cognitivas têm um grande impacto na qualidade de vida dos pacientes e aumentam o desgaste dos cuidadores (LEROI *et al.*, 2012). Em um estudo feito em 5 cidades suecas com 200 pacientes, 93% demonstraram ter alguma alteração cognitiva. Além disso, 82% relataram ter dificuldade em se lembrar de algo, 73% tinham problemas em se expressar e lembrar certas palavras, 51% alegaram não conseguir manter foco e 48% manifestaram dificuldades com aprendizagem (JANZ *et al.*, 2024).

As principais questões cognitivas são o declínio subjetivo cognitivo (DSC), comprometimento cognitivo leve (CCL) e a demência. O DSC é um declínio cognitivo apontado pelo próprio paciente, podendo ser atestado por meio de teste cognitivos (AARSLAND *et al.*, 2021). Existem poucos estudos sobre o DSC e como ele contribui na progressão do declínio cognitivo dos pacientes. No entanto, em 2020 um estudo observou que 53% dos participantes possuíam DSC, além disso, 5 anos depois os pacientes com DSC apresentaram um declínio maior em relação aos pacientes que não tinham DSC (PURRI *et al.*, 2020). Já em relação ao CCL, ele pode ser identificado por um profissional em um ambiente clínico e possui critérios de diagnóstico (LITVAN *et al.*, 2012). Dessa forma, um estudo no

estado da Filadélfia em pacientes sem nenhum diagnóstico de questões cognitivas demonstrou que 50% deles com até 6 anos do diagnóstico de DP desenvolveram CCL e, em até 5 anos, os mesmos foram diagnosticados com demência (PIGOTT *et al.*, 2015). Além disso, 80% dos portadores da doença de DP desenvolvem demência até o fim de suas vidas (HELY *et al.*, 2008b).

Em relação ao diagnóstico de demência na DP, existem duas possibilidades: demência com corpos de Lewy (DCL) e a demência na Doença de Parkinson (DDP). A DCL é definida pela patologia de CL e a ocorrência de demência antes do surgimento de sinais motores ou em até um ano da apresentação deles (MCKEITH *et al.*, 2020). A DDP é diagnosticada quando pacientes da DP possuem déficits cognitivos em pelo menos 2 dos 4 domínios: atenção, funções executivas, habilidades visuoespaciais, e memória, sendo elas severas o suficiente para prejudicar atividade diárias (GOETZ; EMRE; DUBOIS, 2008). Nesse sentido, DCL e DDP são muito similares, sendo sua única característica distintiva o período que elas se apresentam em relação aos sinais motores (AARSLAND *et al.*, 2021).

Nesse período, alucinações visuais são muito presentes, com cerca de 80% dos pacientes as experienciando. Além disso, elas são um aspecto distinto da DCL, auxiliando a definir o diagnóstico. Ademais, o sono REM sem atonia e redução da recaptção de dopamina nos núcleos da base são dois biomarcadores muito utilizados para auxiliar na confirmação do diagnóstico (MCKEITH *et al.*, 2017). Apesar de disfunções no sono REM ocorrerem muito antes da DCL na DP (Figura 2), elas são um excelente biomarcador, tendo em vista que a ausência de atonia no sono REM está mais presente em pessoas com DCL em comparação com pessoas com outras formas de demência, 76% e 4%, respectivamente (FERMAN *et al.*, 2011).

O surgimento de demência em pacientes com DP está intrinsicamente ligado à sua morte e ao estágio final da DP, junto com quedas frequentes e alucinações (Figura 2). Dessa forma, a apresentação do sinal ocorre próxima ao fim da vida dos indivíduos, independente da idade que ele se encontrava (KEMPSTER *et al.*, 2010).

Embora a DDP ocorra somente em um período mais avançado da doença, vários sinais estão presentes muitos antes, como já mencionado, e podem ser diagnosticados por meios de testes (MCKEITH *et al.*, 2017). Além disso, todas essas questões cognitivas aparentam estar interligadas e serem um indicativo de uma progressão de piora cognitiva até inevitavelmente chegar à demência, no entanto, ainda não existe um consenso. Sendo assim, uma maior quantidade de estudos sobre questões cognitivas é necessária. Essa seria uma forma de indicar a presença da DP e sua progressão. Assim, a manifestação de problemas cognitivos, englobando

o surgimento da progressão dos sinais presentes em DSC, da progressão a CCL até finalmente chegar a demência (PURRI *et al.*, 2020), tem o potencial de ser um possível biomarcador para a doença.

Os mecanismos etiológicos da demência na DP ainda não completamente elucidados, mas existem muitos indícios e hipóteses. O aumento de dopamina no estriado em pessoas saudáveis demonstrou uma melhora em esforço cognitivo (WESTBROOK *et al.*, 2020). Além disso, estudos já relataram a influência da dopamina em processos cognitivos no córtex pré-frontal dorsolateral (RANGANATH; JACOB, 2016). Dessa forma, pode-se inferir que a dopamina possui um papel significativo em processos cognitivos. A degeneração de neurotransmissores em pacientes com DP também auxilia no melhor entendimento da correlação com déficits cognitivos. Pacientes com CCL apresentam degeneração de neurônios dopaminérgicos no estriado, principalmente na região do núcleo caudado dorsal em proporção maior que pacientes da DP sem alterações cognitivas. No entanto, outras regiões dopaminérgicas do cérebro se mantêm majoritariamente íntegras. Já pacientes com DPP apresentam degeneração dopaminérgica considerável do córtex frontal, parietal e temporal (SASIKUMAR; STRAFELLA, 2020). A neurodegeneração de neurônios noradrenérgicos também pode ser observada tanto em CCL quanto em DPP. Esses neurônios estão envolvidos em vários processos, principalmente atenção, flexibilidade comportamental memória de trabalho e de longo prazo. Os neurônios colinérgicos também são comprometidos apresentando degeneração em pacientes com CCL e mantendo o mesmo padrão para DPP, eles têm um papel fundamental no processamento cognitivo (AARSLAND *et al.*, 2021).

1.1.3.4. Ansiedade e depressão na DP

Ansiedade e depressão ocorrem em por volta de 30 – 50% de pacientes com a DP (BROEN *et al.*, 2016; MARRAS *et al.*, 2024), embora esse número provavelmente represente um subdiagnóstico, sendo menor que o número real. Sendo assim, muitos locais não avaliam transtornos depressivos ao tratar pacientes, com uma taxa de diagnóstico menor que 40% de acordo com a *American Academy of Neurology* (MARRAS *et al.*, 2024). A dificuldade de diagnosticar ansiedade e depressão é devido à sobreposição com outros aspectos da doença como falta de apetite, hipomimia, e mudanças no sono (GOLDMAN, 2025). Levando isso em consideração, um estudo em 2024 apresentou taxas muito maiores que as relatadas na literatura com 77% dos participantes apresentando depressão e 53% precisavam de intervenção

medicamentosa. Além disso, 78% possuíam ansiedade e 56% era recomendada o uso de medicamentos (JANZ *et al.*, 2024), reforçando que possivelmente seja uma falha na triagem clínica dos pacientes. Taxas de ideação suicidas aparentam ser maiores que se imaginava, estudos revelam que existe uma prevalência de 22% de risco suicídio, sendo o dobro dos grupos controle (MAI *et al.*, 2024).

1.1.4. Tratamentos disponíveis para a doença de Parkinson

Em geral, tratamentos de DP possuem efeito quando iniciados, no entanto, ao longo prazo apresentam perda de eficácia e efeitos adversos deletérios (MONGE-FUENTES *et al.*, 2021). Tratamentos para DP são mais focados em amenizar os sinais do que curar propriamente a doença (MULEIRO ALVAREZ *et al.*, 2024). Neurotransmissores dopaminérgicos sempre foram o principal alvo farmacológico desde o descobrimento da perda dopaminérgica no estriado (JING *et al.*, 2023). Muitos medicamentos utilizados na DP visam suprir a ausência de dopamina no encéfalo, como Levodopa, agonistas de dopamina e inibidores monoamina oxidase B(MAO-B).

A BHE é uma barreira de difusão que separa fisicamente o sistema nervoso central (SNC) do sistema sanguíneo, sendo ela semipermeável e extremamente seletiva (SWEENEY; SAGARE; ZLOKOVIC, 2018). Ela é uma das responsáveis pela regulação do transporte de moléculas necessárias para o funcionamento do SNC. Além disso, ela mantém toxinas, componentes plasmáticos e patógenos do lado exterior (ALAHMARI, 2021). Nesse sentido, ela é o principal controle de transporte entre o SNC e o resto do corpo, sendo vital para a homeostasia do SNC (SCARPA *et al.*, 2023). Isso é possível devido à unidade neurovascular composta por células endoteliais, pericitos e astrócitos criando um espaço altamente regulado (ALAHMARI, 2021).

A passagem pela BHE é um dos principais desafios quando buscando possíveis tratamentos para a DP. Ela é a razão do porquê é utilizado a Levodopa (L-dopa), a precursora da dopamina, uma vez que a dopamina não passa a BHE, já a L-dopa é transformada nela após passar a barreira. Levando isso em consideração, muitos estudos tentam lidar com isso utilizando nanopartículas capazes de fazer esse transporte protegendo o composto e evitando que ele seja metabolizado ou barrado pela BHE. Alguns estudos buscam usar nanotecnologia

junto a um aumento de permeabilidade da barreira para maior eficiência possível em relação à passagem do medicamento (WU *et al.*, 2024).

1.1.4.1. Levodopa

A Levodopa (L-dopa) é o medicamento mais utilizado para o tratamento da DP, sendo descrita pela primeira vez em (BIRKMAYER; HORNYKIEWICZ, 1962). Apesar de ser utilizada há mais de 60 anos, ela segue sendo considerada o padrão ouro de tratamento para a DP, em algum momento basicamente todos os pacientes vão usá-la (HAYES, 2019). Como um precursor da dopamina, a L-dopa visa suprir a deficiência dopaminérgica do encéfalo (YADAV *et al.*, 2025). Dessa forma, sua longevidade mostra a importância da dopamina na DP, mas ao mesmo tempo demonstra a dificuldade de encontrar outros alvos como alternativa.

apesar da sua grande importância no tratamento da DP, isso não significa que ela não possui inúmeras falhas. Pacientes tratados com L-dopa tendem a apresentar flutuações dos seus sinais, além de gerar complicações motoras (JING *et al.*, 2023). O uso crônico de L-dopa gera no paciente discinesias, no entanto os mecanismos por trás desse efeito ainda não são muito bem compreendidos. Cerca de 80% dos pacientes desenvolvem discinesia, com 30% deles desenvolvendo nos primeiros 3 anos do tratamento (KWON *et al.*, 2022). A principal causa é atribuída à entrega inconsistente do fármaco, devido à sua baixa meia vida, tendo então variabilidade na absorção gastrointestinal e transporte pela BHE (POEWE *et al.*, 2017). Sendo assim, o principal objetivo quando utilizando L-dopa é otimizar ao máximo a ação terapêutica sem o aumento de concentração no plasma acima do limiar de discinesia. Nesse sentido, visando a maior biodisponibilidade possível, Carbidopa é administrada em conjunto com a L-dopa inibindo a conversão periférica antes da chegada ao SNC (REICHMANN, 2023).

Pacientes que fazem uso constante, experienciam o fenômeno “*on-off*” do medicamento. Ele tem sido documentado de forma extensiva desde a implementação da L-dopa, sendo observado rigidez, acinesia e crises de pânico nos momentos de ausência de efeito (MARSDEN; PARKES, 1976), outros distúrbios de humor também podem sofrer flutuações durante o “*off*”, como ansiedade e disforia (KIM *et al.*, 2018).

1.1.4.2. Outros tratamentos disponíveis

Agonistas de dopamina estimulam receptores dopaminérgicos no SNC, com isso, aliviando sinais da doença. Apesar de seu efeito ser menor que o da L-dopa, eles são muito utilizados por terem uma maior meia vida e causarem menos discinesia (HAYES, 2019).

Selegilina e Rasagilina são inibidores de MAO-B que são usados no tratamento da DP, separados ou utilizados juntos à L-dopa como forma de diminuir as flutuações. MAO-B é uma enzima responsável pela degradação de dopamina, logo, ao utilizar inibidores da enzima, reduzem sua atividade e aumentam os níveis de dopamina no encéfalo (YI et al., 2024)

Outros inibidores utilizados são os de Catecol O-Metiltransferase (COMT), enzima que biotransforma a L-dopa. Medicamentos como Entacapona e Tolcapona reduzem a atividade da enzima. Esses medicamentos são utilizados para auxiliar na redução de momentos “off” induzidos pela L-dopa (MÄNNISTÖ *et al.*, 2024). A estratégia de utilizar a Tolcapona junto com a L-dopa é menos prescrita devido ao comprometimento hepático que ela causa no paciente. Já a Entacapona é usada junto à Carbidopa (LCE), ela é capaz de melhorar a farmacocinética da L-dopa, possibilitando a redução da dose de L-dopa sem reduzir o efeito terapêutico. No entanto, a terapia combinada LCE também possui efeito colaterais como, insônia, tontura, náusea, diarreia e hipotensão (REICHMANN, 2023).

Existem também tratamentos não farmacológicos que podem aliviar os sinais e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Atividades como fisioterapia podem dar mais equilíbrio, força e estabilidade aos portadores da doença. Além disso, terapia ocupacional pode ajudar em atividades rotineiras e a adaptá-las por meio de equipamentos, caso necessário (LEE *et al.*, 2024).

Técnicas mais invasivas também podem ser necessárias para pacientes refratários ao tratamento, a *Deep Brain stimulation* (DBS) é a implementação de eletrodos por meio de um procedimento cirúrgico (SANDOVAL-PISTORIUS *et al.*, 2023; SHAN *et al.*, 2023). Os eletrodos geram um pulso capaz de auxiliar na regulação de impulsos anormais.

Apesar dos tratamentos atuais prolongarem a vida do paciente e melhorarem sua qualidade de vida, nenhum deles curam a doença. Além disso, apesar de serem tratamentos consolidados e comprovados, flutuações de sinais, efeitos colaterais e progressão da doença ainda ocorrem. Sendo assim, retardar a degeneração da doença e prorrogar sinais motores e não-motores, devem ser os principais objetivos quando se trata de futuros tratamentos (POEWE *et al.*, 2017).

1.1.4.3. Medicamentos visando a melhora de sinais não-motores

Em relação ao uso de terapias dopaminérgicas para o tratamento de sinais não-motores, não existem tratamentos padrão para a DP, preconiza-se a melhora nos sinais motores na esperança de também aliviar os não-motores (REICHMANN, 2023). Alguns sinais não-motores possuem opções de medicamentos que são utilizados clinicamente. Para depressão, dois medicamentos são mais utilizados, a Paroxetina (inibidor seletivo da recaptação de serotonina) que tem como efeitos adversos sedação, disfunção sexual, anorexia e irritação gastrointestinal e a Velaxin XR (inibidores seletivos da recaptação da serotonina e da noradrenalina), que possui os efeitos adversos hiperidrose, sedação, insônia e irritação gastrointestinal. Em relação ao tratamento para insônia, a Amitriptilina é utilizada, mas ela possui uma extensa lista de efeitos adversos, como: constipação, sedação matinal, retenção urinária boca e olhos secos (WALLER *et al.*, 2021).

Opções de tratamento para os distúrbios de ansiedade na DP são limitados e testes clínicos com portadores são raros. Um estudo testou o uso de Buspirona para o tratamento de ansiedade por 12 semanas, onde mais de 40% dos participantes abandonaram o tratamento antes do término do período e mais da metade dos indivíduos apresentaram piora motora ao decorrer do tempo (SCHNEIDER *et al.*, 2020).

A *International Parkinson and Movement Disorder Society* (MDS) faz revisões periódicas catalogando e avaliando novos estudos com tratamentos para sinais não-motores, com sua última versão publicada em 2019. Nela, eles concluíram que, apesar de estudos apresentando possíveis tratamentos terem aumentado significativamente, as opções de tratamento para sinais não-motores seguem limitadas. Nesse sentido, o desenvolvimento de novos tratamentos segue sendo uma prioridade (SEPPI *et al.*, 2019).

1.1.4.4. Peptídeos Terapêuticos para a DP

Devido à limitação dos tratamentos disponíveis, existe uma busca por alternativas, surgindo muitas pesquisas explorando possíveis opções como terapia genética, nanomedicina e peptídeos.

Animais peçonhentos possuem glândulas especializadas capazes de gerar secreções que produzem dor, paralisia ou até morte. Sendo assim, anos de pressão evolutiva tornaram essas

peçonhas ricas em peptídeos que podem agir de forma específica em alvos fisiológicos, devido a sua alta especificidade com canais iônicos e receptores (YANG *et al.*, 2018). Um bom exemplo, é o Exenatida (precursor do Ozempic), que é um peptídeo sintético agonista de receptores de GLP-1 com 49 resíduos aminoácido, sendo utilizado no tratamento de diabetes tipo 2. Ele foi bioinspirado no peptídeo natural exadina-4 que é encontrado na saliva de lagartos da espécie *Heloderma suspectum* (PARKES; MACE; TRAUTMANN, 2013). Além disso, a exenatida demonstrou propriedades neuroprotetoras em testes pré-clínicos na DP, em testes clínicos o peptídeo apresentou melhora dos sinais em pacientes com Parkinson a DP em comparação com o grupo placebo (ATHAUDA *et al.*, 2017).

O peptídeo fraternina é encontrada na peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus* e em um modelo de 6-OHDA de camundongos, ele se mostrou capaz de evitar neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos e melhorou déficits motores em suana dose terapêutica de 10 µg/animal (BIOLCHI *et al.*, 2020). Visando melhorar seus efeitos terapêuticos e a biodisponibilidade, foi idealizado e sintetizado o peptídeo fraternina-10 (Fra-10), que possui 10 resíduos de aminoácidos. A Fra-10 apresentou uma taxa de 50% de similaridade com o um trecho do peptídeo exadina-4 (Figura 3). Além disso, animais tratados com o peptídeo Fra-10 apresentou apresentaram melhora motora em relação ao grupo 6-OHDA, mas demonstrou toxicidade em todas as doses testadas (MAYER *et al.*, 2024).

Fraternina

L-S-F-K-Q-V-K-E-K-V-C-K-V-A-E-K-L-G-K-K-L-P-F-C-OH

Fraternina-10

L-S-F-Q-K-V-K-E-K-V-NH

Exadina-4

H-G-E-G-T-E-T-S-D-L-S-K-Q-M-E-E-E-A-V-R-L-F-I-E-W-L-K-N-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S

Figura 3. Sequência dos resíduos de aminoácido, dos peptídeos Fraternina, Fraternina-10 e Exadina-4. Adaptado de Mayer et al., 2024.

1.2.Nanotecnologia no tratamento de Parkinson

O uso de nanotecnologia vem crescendo com o passar dos anos, sendo vista como uma alternativa para a melhora de tratamentos de doenças que afligem grande parte da população. Uma área de pesquisa que a nanotecnologia vem sendo muito usada é a de tratamento de câncer (GRAVÁN *et al.*, 2023), tendo em vista que a maioria das drogas usadas não possuem boa permeabilidade e solubilidade, acarretando em uma baixa biodisponibilidade do fármaco. Além disso, muitas desses fármacos são inespecíficas e já são usadas em doses máximas, causando vários efeitos adversos ao paciente. Nanopartículas podem ser formuladas de forma extremamente personalizada com um intuito específico, dando a ela muito eficiência para chegar no alvo farmacológico (ALABRAHIM; AZZAZY, 2022). Desta forma, nanopartículas se mostram opções muito valiosas, tendo a capacidade de aumentar a biodisponibilidade sem a necessidade de aumentar a dose de um composto, tornando o tratamento mais eficaz e menos custoso ao bem-estar do paciente (DIN *et al.*, 2017). Nanopartículas podem ser formadas de vários materiais, possuir vários formatos e serem de tamanhos variados.

Medicamentos utilizados para a DP se encontram em uma situação similar. Como já mencionado, os medicamentos possuem muitos efeitos adversos e provocam empecilhos à qualidade de vida dos pacientes. Sendo assim, estratégias que tornam a entrega do medicamento mais precisa e que facilitam a passagem pela BHE vem se tornando cada vez mais populares. O pequeno tamanho e a alta área de superfície das nanoestruturas se mostram muito valiosas para a passagem da BHE, sendo ela o principal fator e obstáculo em relação a biodisponibilidade dos fármacos antiparkinsonianos. Além disso, a nanotecnologia pode ser usada tanto no tratamento quanto no diagnóstico. Dessa forma, se mostra valiosa e ganha notoriedade para o avanço da pesquisa em DP.

As principais nanoformulações utilizadas para DP são nanopartículas lipídicas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas metálicas e nanopartículas à base de carbono. Estudos utilizaram nanoformulações acopladas a Levodopa ou dopamina visando melhorar sua biodisponibilidade e reduzir os efeitos colaterais, ediferentes nanopartículas e vias foram testadas (ARISOY *et al.*, 2020; MONGE-FUENTES *et al.*, 2021). Nanopartículas podem ser usadas de forma conjunta à terapia gênica, sendo um facilitador da entrada do gene ao seu local desejado (KRSEK; BATICIC, 2024).

1.2.1. Tipos de nanopartículas

Normalmente, as nanopartículas tendem ser divididas as em 3 categorias, orgânicas, inorgânicas e com base de carbono (figura 4).

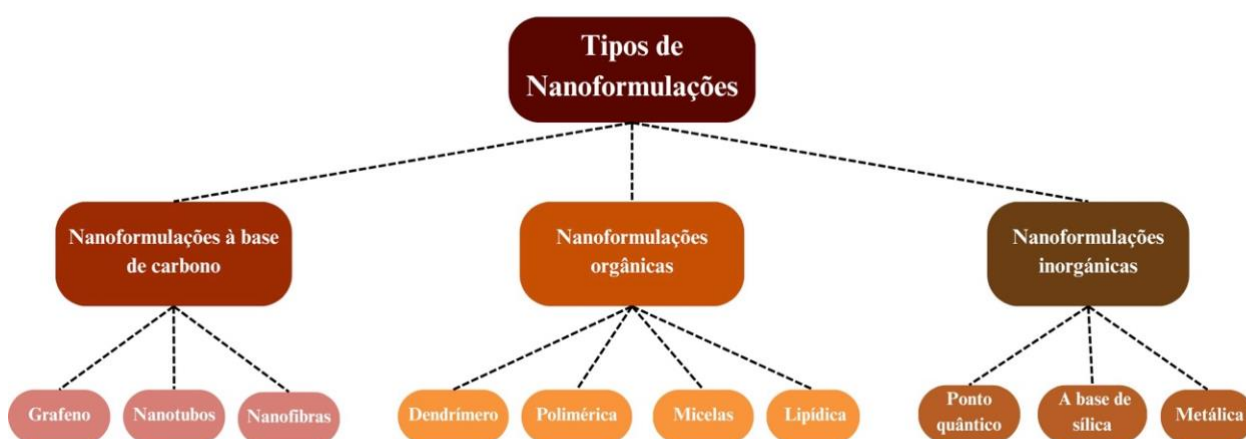


Figura 4. Esquema representativo das nanoformulações mais utilizadas e seus diferentes subtipos. Adaptado de Yadav et al., 2025.

Nanopartículas poliméricas são compostas por polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, como ácido polilático e ácido poliglicólico (BHARDWAJ; JANGDE, 2023). A principal vantagem de utilizar essa nanopartícula é uma liberação controlada com um ritmo constante, isso reduz a frequência das administrações, facilitando para o paciente e aumentando a taxa de adesão aos tratamentos. A liberação controlada ocorre devido aos polímeros serem dissolvidos naturalmente no corpo, sendo assim, a degradação da nanopartícula proporciona uma taxa pré-determinada que o composto é liberado (CHAKRABORTY *et al.*, 2024). Um estudo utilizou uma nanopartícula polimérica composta por ácido polilático envelopando L-dopa com administração via intranasal, mostrando menos efeitos colaterais e maior biodisponibilidade. Ele teve uma taxa de retenção de 73% e liberou a L-dopa por 9 horas (ARISOY *et al.*, 2020). Ademais, outro estudo foi capaz de reduzir discinesia utilizando uma nanopartícula auto-formuladora que forma um copolímero com a L-dopa, dessa forma regulando sua liberação (VONG *et al.*, 2020).

Nanopartículas metálicas apresentam muita utilidade devido às suas propriedades eletrônicas e ópticas. Elas podem ser compostas por diversos metais, os principais sendo prata, cobre, ouro, cobalto ou ferro (BURLEC *et al.*, 2023). Nanopartículas formadas por metais nobres como prata e ouro possuem alta estabilidade e vêm mostrando potencial em prevenir agregação proteica (KHAIRNAR; JHA; RAJWADE, 2023). Além disso, uma nanopartícula de ouro foi capaz de reduzir estresse oxidativo em um modelo de MPTP em camundongo (PARK *et al.*, 2019).

Nanopartículas à base de carbono possuem alta força mecânica, uma grande superfície de área e uma excelente capacidade de penetrar membranas celulares. Elas podem ser formuladas de três diferentes matérias: nanotubo, fulereno e grafeno. Nanopartículas de nanotubos possuem dois tipos estruturais de parede simples, composta por somente uma camada de átomos de carbono e de parede múltiplas, que possuem várias camadas (RAO *et al.*, 2021).

Nanopartículas lipídicas são majoritariamente compostas por lipídeos, elas são capazes de encapsular compostos hidrofóbicos e hidrofílicos. O uso de lipídios é extremamente vantajoso, tendo em vista sua alta biocompatibilidade com o corpo humano e capacidade de se ligar com membrana das células (YADAV *et al.*, 2025). Nesse sentido, esses fatores tornam as nanopartículas mais versáteis e permitem maior biodisponibilidade. Nanopartículas de base lipídica vem sendo muito utilizadas devido a sua habilidade de entrega com fármacos da classe 2, baixa solubilidade e alta permeabilidade, e classe 4, baixa solubilidade e baixa permeabilidade (GRAVÁN *et al.*, 2023).

Nanopartículas de base lipídica são classificadas de acordo com a forma que se encontra sua estrutura lipídica, podendo ser divididas das seguintes maneiras: nanoemulsão lipídica (NEL), nanopartícula lipídica líquida (NLL), nanopartícula lipídica sólida (NLS), carreador lipídico nanoestruturado (CLN) e nanocápsula lipídica (NCL) (Figura 5) (Graván 2023).

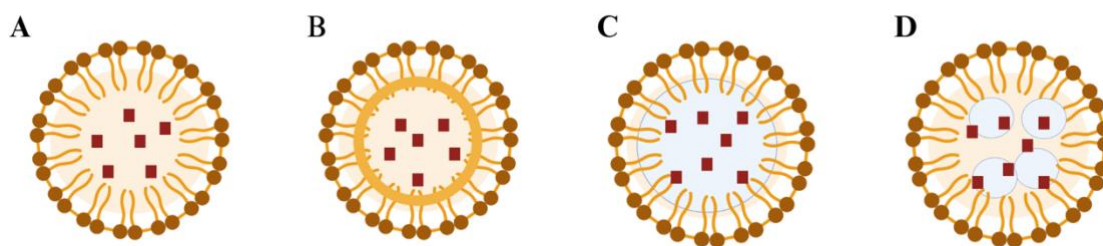


Figura 5. Representação imagética da estrutura dos principais tipos de nanopartículas lipídicas. (A) Nanoemulsão Lipídica. (B) Nanocápsula lipídica. (C) Nanopartícula lipídica sólida. (D) Carreador lipídico nanoestruturado. Adaptado de Graván et al., 2023.

Nanopartículas lipídicas líquidas (NLL) são nanoformulações que possuem seu centro lipídico líquido em temperatura ambiente, sendo os principais tipos nanoemulsão lipídica (NEL) e nanocápsula (NCL).

Nanoemulsões são formulações bifásicas, como se trata de uma junção imiscível, elas são sistemas sem equilíbrio que tendem a se separar. No entanto, possuem alta estabilidade cinética. Nanoemulsões podem ser óleo em água ou água em óleo (SINGH *et al.*, 2017), para aplicações terapêuticas são mais utilizadas óleo em água, que seriam nanogotículas de óleo dispersas em água.

O termo nanocápsula surgiu pela primeira vez em 1977 (COUVREUR *et al.*, 1977), e pode ser definido como um sistema vesicular com uma cavidade interna de estrutura dura e centro líquido (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Sendo assim, o composto está envolto por uma casca que o protege. Existem duas formas que o composto pode ser nanoencapsulado, restringido ao centro líquido da nanocápsula ou ligado a própria estrutura que o envolve. A cápsula pode ser formada por dois substatos, uma cápsula polimérica ou uma cápsula formada por surfactante (GRAVÁN *et al.*, 2023). As NCLs vem sendo muito utilizadas

para a passagem da BHE, auxiliando no desenvolvimento de fármacos utilizados em tratamentos para doenças neurológicas e neurodegenerativas (MOURA *et al.*, 2020).

A primeira vez que o termo nanopartícula sólida foi usado foi em 1994, ela foi formulada utilizando um lipídeo derretido disperso em água em temperatura a 70 °C por meio de uma homogeneização de alta pressão (Schwarz 1994). NLS são feitas de lipídios que são sólidos em temperatura ambiente, dessa forma, seu centro é composto de uma matriz sólida envolta pelo surfactante, isso proporciona uma maior estabilidade à nanoformulação. No entanto, a cristalização do lipídio também é a causa da baixa taxa de encapsulação do composto escolhido (Graván 2023). A dureza da estrutura lipídica é o fator determinante na velocidade da liberação do composto, dando à nanopartícula maior controle (LOIRA-PASTORIZA; TODOROFF; VANBEVER, 2014). Além disso, podem acontecer mudanças conformacionais na estrutura do cristal, acarretando na expulsão do composto envolto pela nanopartícula de forma exacerbada e sem controle (MEHNERT; MÄDER, 2012).

As CLNs surgiram em 2002 devido às deficiências das NLS relatadas anteriormente, buscando então ser uma alternativa mais eficiente (Muller 2002). Diferente das NLSs, que possuem uma matriz sólida, CLNs possuem uma mistura em sua matriz sendo sólida e líquida. No entanto, em temperatura ambiente ela fica no estado sólido. Sendo assim, as CLNs adquirem uma maior capacidade de carreamento comparado à NLS, testada pela primeira vez usando o retinol (Jenning 2008). Outra vantagem em relação a NLS é que a adição de um óleo ao lipídio sólido previne a formação de cristais, ou seja, não há mudanças conformacionais, reduzindo a chance da expulsão do fármaco acidentalmente (KECK; SPECHT; BRÜSSLER, 2021).

1.2.2. Via intranasal no tratamento de doenças do SNC

No entanto, mesmo com o auxílio da nanotecnologia, a passagem pela BHE ainda se mostra uma questão importante no tratamento de doenças do SNC. Por conta disso, muitos pesquisadores começaram a explorar vias que a evitassem. Dessa forma, a via intranasal vem sendo muito utilizada, já que os compostos são diretamente entregues dentro do encéfalo, por meio do bulbo olfatório (TELEANU *et al.*, 2018), dando a possibilidade de entregar moléculas complexas ao SNC de forma não invasiva (SAMARIDOU; ALONSO, 2018).

A primeira vez que foi documentada a ligação direta do nariz para o cérebro foi em 1937 por Faber, administrando tinta na narina de coelhos (FABER, 1937). Apesar de ter sido descrita

no meio do século, a via ganhou notoriedade somente a partir da década de 90, com estudos compreendendo melhor os mecanismos de transporte da via (SAKANE *et al.*, 1991). Adicionalmente, passou a ser vista como uma opção em tratamentos de doenças neurodegenerativas (FREY *et al.*, 1997).

Estudos apontam que a principal passagem de compostos do nariz para o cérebro é por meio do bulbo olfatório. O entendimento dos mecanismos por trás da ligação direta entre o nariz e o cérebro ainda não foram esclarecidos completamente (SAMARIDOU; ALONSO, 2018). No entanto, a baixa permeabilidade dos fármacos pela mucosa nasal e a limpeza mucociliar, podem se mostrar limitações, afetando a biodisponibilidade (AGRAWAL *et al.*, 2018). Além disso, encontrar o alvo farmacológico desejado pode ser dificultado (QUINTANA *et al.*, 2015). A administração de um fármaco livre que permeia a BHE por meio da via intranasal e outras vias não apresenta muita diferença de biodisponibilidade, por volta de 1% (SAMARIDOU; ALONSO, 2018). No entanto, quando agindo em conjunto com outro composto, observa-se uma diferença, como o uso de quitosana que mostrou concentração 13 vezes maiores (VAKA *et al.*, 2009). Visando driblar as limitações, a utilização de nanopartículas se mostra muito valiosa, podendo aumentar a interação com a mucosa olfatória.

A junção da via intranasal com a nanotecnologia tornou possível o uso de moléculas maiores, como peptídeo e proteínas no tratamento de doenças neurodegenerativas. O primeiro registro foi em 2007 com uma nanopartícula envelopando um neuropeptídeo para o tratamento da Doença de Alzheimer por meio da via intranasal (GAO *et al.*, 2007). Desde então, inúmeras formulações de nanopartículas vêm sendo desenvolvidas buscando otimizar a biodisponibilidade por esta via (TELEANU *et al.*, 2018).

1.3. Modelos pré-clínicos da DP

1.3.1. Principais modelos empregados

Em relação à DP, ainda existem muitas perguntas a serem respondidas, especialmente no que tange a sinais não-motores. Testes clínicos requerem muito mais tempo e enfrentam maior dificuldade em encontrar grupos que se encaixem nos estudos. Dessa forma, estudos pré-

não clínicos com modelos animais podem auxiliar a responder as perguntas, tendo em vista a maior facilidade de executá-los.

Os sinais não-motores são mais difíceis de serem reproduzidos em comparação com sinais motores, que a grande maioria dos modelos em roedores conseguem expressar em sua totalidade (GUIMARÃES *et al.*, 2024). Em estudos pré-não clínicos, muitos modelos podem ser utilizados, sendo os principais modelos de neurotoxinas, genéticos e não transgênicos de alfa-sinucleína. Nenhum modelo é capaz de reproduzir todos os aspectos da DP, logo a escolha do modelo é de acordo com os aspectos desejados para análise. O primeiro modelo animal surgiu no meio do século passado, utilizando a droga Reserpina para reproduzir características da DP (CARLSSON; LINDQVIST; MAGNUSSON, 1957)(Figura 6). Os modelos de toxina surgiram logo em seguida (Figura 7), tendo a capacidade de reproduzir muito bem uma neurodegeneração avançada de forma rápida e aguda, possibilitando grandes avanços na área.

Modelos usando as neurotoxinas foram e continuam sendo muito utilizados. Além disso, são um dos mais antigos, surgindo no meio do século 20 com o uso da 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em roedores (UNGERSTEDT, 1968) (Figura 6). As toxinas mais utilizadas são a 6-hidroxidopamina, MPTP, paraquat e rotenona, sendo os modelos de 6-OHDA e MPTP os mais populares. O modelo de MPTP surgiu em 1982 (Figura), após um adulto apresentar sintomas avançados de Parkinsona DP, após o uso da substância que era para ser um análogo da heroína, mas sua formulação deu errado (LANGSTON, 2017). O primeiro modelo animal de usando MPTP foi em primatas (STANLEY BURNS *et al.*, 1984) e em camundongos (Heikika 1984) em 1984 (Figura). Paraquat é um herbicida muito utilizado, ele começou a ganhar atenção devido a sua familiaridade à MPP+, que é o princípio ativo do MPTP. Nesse sentido, a primeira vez que ele foi testado foi em um modelo animal em 1985 que utiliza em sapos, onde os animais apresentaram degeneração da substantia nigra (BARBEAU *et al.*, 1985). No entanto, a toxina foi testada em camundongos somente em 1999 (Figura), mostrando perda de neurônios dopaminérgicos e déficits motores (BROOKS *et al.*, 1999). O último modelo surgiu somente um ano depois, o modelo de rotenona, que também é um pesticida (BETARBET *et al.*, 2000) (Figura 7). Além disso, como a toxina é infundida no animal varia de acordo com sua capacidade de passar a BHE, sendo de forma sistêmica (MPTP, Paraquat e Roteonona) ou intracraniana intracerebral (6-OHDA).

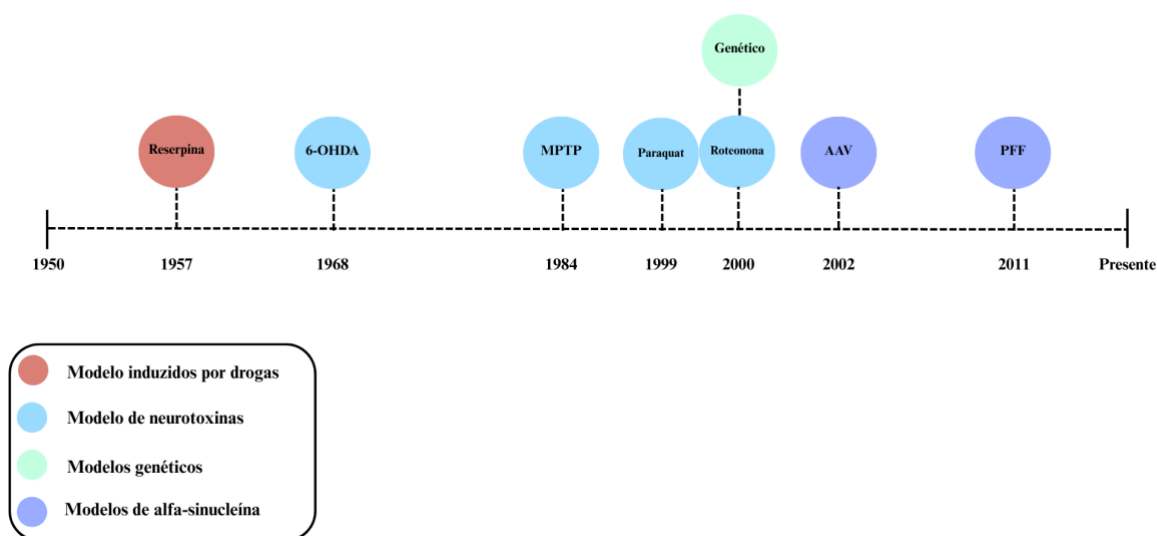


Figura 7. Linha do tempo do surgimento de novos modelos animais.

Modelos de neurotoxina tem como característica mais distinta sua capacidade de gerar neurodegeneração, principalmente em neurônios dopaminérgicos. Nesse sentido, todas as toxinas geram perda dopaminérgica em células, que dão origem aos sinais motores e não-motores, mas nem em todos essa perda é permanente. Nos modelos de MPTP e Reserpina, seus efeitos são revertidos após um certo tempo após a administração (DOVONOU *et al.*, 2023).

Modelos genéticos tendem a ter resultados variados em relação à reprodução de aspectos da DP, dependendo de onde foi feita a mutação. Nesse sentido, a neurodegeneração em modelos de SNCA é inconsistente, com pouca neurodegeneração sendo apresentada (JANEZIC *et al.*, 2013). Um modelo mais novo usando a bactéria (BAC)-SNCA A53T apresentou melhora nesse aspecto, mas a perda ainda é moderada (TAGUCHI *et al.*, 2020). Modelos de LRRK2 apresentam perda de neurônios dopaminérgicos na *substantia nigra pars compacta* (SNPC) associada ao envelhecimento (XIONG *et al.*, 2018).

Ambos os modelos de alfa-sinucleína são capazes de gerar neurodegeneração. Modelos de AAV em camundongos infundidos na via nigroestriatal apresentam perda progressiva de neurônios dopaminérgicos na SNPC (OLIVERAS-SALVÁ *et al.*, 2013). Em relação a modelos de PFFs, houve neurodegeneração tanto quando administrado no estriado (EARLS *et al.*, 2019) quanto na *substantia nigra* (HARMS *et al.*, 2017). Apesar de modelos de alfa-sinucleína apresentarem

neurodegeneração, ela não é imediata como em modelos de neurotoxinas, demorando alguns meses.

Apesar de modelos de neurotoxinas serem conhecidos pelas suas incapacidades de alfa-sinucleinopatias, modelos como MPTP (HU *et al.*, 2020) e rotenona (LEÃO *et al.*, 2015) são capazes de aumentar a concentração de alfa-sinucleína, já os outros 2 modelos não conseguem replicar esse aspecto da doença (Tabela 2). Como esperado, ambos os modelos de alfa-sinucleína, AAV e PFF, apresentam alfa-sinucleinopatias (LUK *et al.*, 2012; OLIVERAS-SALVÁ *et al.*, 2013). Em modelos de SNCA, também há a presença de acúmulo de alfa-sinucleína (GIASSON *et al.*, 2002). Não existe consenso em relação a modelos de LRRK2 (LAMA *et al.*, 2021).

Em relação à disfunção mitocondrial, alguma forma de disfunção mitocondrial pode ser observada em todos os modelos. Modelos de neurotoxinas tem por característica inibição de pelo menos um complexo da cadeia transportadora de elétrons, logo 6-OHDA (KUPSCH *et al.*, 2014), MPTP (ARAI *et al.*, 1990), parquat (CZERNICZYNIEC *et al.*, 2011) e rotenona (RAMONET *et al.*, 2011) geram disfunções mitocondriais. Pode ocorrer acúmulo de alfa-sinucleína na mitocôndria que gera disfunções no complexo 1, ambos modelos de AAV (GARCIA *et al.*, 2020) e PFF (GRASSI *et al.*, 2018) são capazes de reproduzir isso. Modelos genéticos de SNCA (MARTIN *et al.*, 2006) e LRRK2 também geram disfunção mitocondrial (RAMONET *et al.*, 2011) (Tabela 2).

Tabela 2. Aspectos da Doença de Parkinson que cada modelo animal é capaz de reproduzir

Modelo	Neurodegeneração dopaminérgica	Déficit motor	Disfunção mitocondrial	Neuroinflamação	Alfa-sinucleinopatias
6-OHDA	✓	✓	✓	✓	
MPTP	✓	✓	✓	✓	✓
Reserpina	✓	✓			
Paraquat	✓	✓	✓	✓	✓
Rotenona	✓	✓	✓	✓	
PFFs	✓	✓	✓	✓	✓
SNCA	✓	✓	✓		✓
LRRK2	✓	✓	✓	✓	

1.3.2. Reprodução de sinais não-motores em modelos animais

Apesar de disfunção em outras áreas do cérebro encéfalo ser fundamental para os sinais não-motores, pouco se sabe sobre ela em relação aos modelos animais (LAMA *et al.*, 2021). No entanto, os sinais não-motores podem ser observados por meio de testes comportamentais. Cada modelo animal tem a capacidade de reproduzir diferentes sinais da DP (Tabela 3).

Em relação às questões cognitivas, a maioria dos modelos conseguem reproduzir pelo menos algum déficit cognitivo. Modelos de doses repetidas de reserpina conseguem gerar falta de reconhecimento de novidade (SILVA-MARTINS *et al.*, 2021). Os outros modelos de toxinas conseguem reproduzir vários déficits cognitivos. Para a avaliação de sinais não-motores, e estudos em com MPTP tendem a ser em macacos (PESSIGLIONE *et al.*, 2004), já nos outros modelos de toxina o uso de roedores é mais comum, como com Rotenona (KAUR; CHAUHAN; SANDHIR, 2011), 6-OHDA (GROSPE; BAKER; RAGOZZINO, 2018) e Paraquat (HOU *et al.*, 2019). O modelo usando as PFFs demonstrou déficits cognitivos, mas a inserção das fibrilas foi por meio do trato gastrointestinal (KIM *et al.*, 2019). Em modelos genéticos, modelos de LRRK2 aparentam apresentar resultados inconsistentes. Alguns modelos demonstram déficits (PISCHEDDA *et al.*, 2021), mas outros não (BICHLER *et al.*, 2013), já em modelos de SNCA houve redução de reconhecimento social (MAGEN *et al.*, 2015). De forma similar aos déficits cognitivos, problemas de olfato e gastrointestinais também

são vistos na maioria dos modelos animais, dos mais utilizados os sinais não são encontrados somente no modelo de reserpina (LAMA *et al.*, 2021).

Distúrbios de sono estão presentes em muitos modelos animais. Modelos de neurotoxinas são capazes de reproduzir sinais similares aos presentes na fase prodrômica. No modelo de MPTP, déficits no sono REM e sonolência foram observados em primatas. Modelos de 6-OHDA (VO *et al.*, 2014) e rotenona (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2005) apresentam comportamentos similares, porém em camundongos. Em modelos de PFF, alterações no sono foram observadas somente quando as fibras foram administradas na região do núcleo tegmental laterodorsal (SHEN *et al.*, 2020). Modelos genéticos de SNCA e LRRK2 também demonstram déficits em relação ao sono (CLARKE *et al.*, 2019; CROWN *et al.*, 2020). Quanto à distúrbios de humor, os mais estudados são ansiedade e depressão. Somente modelos de neurotoxinas, com exceção de reserpina e PFF, são capazes de gerar comportamentos ansiosos e depressivos nos animais (GUIMARÃES *et al.*, 2024).

Tabela 3. Sintomas motores e não-motores que cada modelo é capaz de replicar.

Modelo	Bradicinesia	Rigidez Postural	Tremor de repouso	Rigidez Muscular	Problemas de Olfato	Distúrbios de Sono	Déficits cognitivos	Disfunções gastrointestinais	Ansiedade	Depressão
6-OHDA	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
MPTP	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓
Reserpina	✓	✓				✓	✓			
Paraquat	✓	✓			✓		✓	✓	✓	✓
Rotenona	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓
PFFs	✓				✓	✓	✓	✓	✓	✓
SNCA	✓				✓	✓	✓	✓		
LRRK2		✓		✓	✓	✓	✓	✓		

1.3.3. Modelo utilizando a neurotoxina 6-OHDA

O modelo de 6-OHDA é um dos modelos de neurotoxinas mais antigos e mais utilizados em testes pré-não clínicos da DP, sendo um contribuinte fundamental ao entendimento da

doença ao longo dos anos. Dessa forma, o modelo de 6-OHDA em roedores é capaz de reproduzir vários aspectos da doença como disfunções neurológicas além da via nigroestriatal, estresse oxidativo, neuroinflamação, disfunção mitocondrial e disfunção mitocondrial (Lama 2021). A 6-OHDA é rapidamente oxidada em produtos neurotóxicos capazes de gerar EROS e disfunção mitocondrial por meio da inibição da cadeia transportadora de elétrons nos complexos 1 e 4 (VAREŠLIJA *et al.*, 2020).

Quando utilizando o modelo de 6-OHDA, existem uma multitude ampla de variações dentro do modelo. Primeiramente, dois tipos de lesões são possíveis, sendo elas unilateral, onde a neurotoxina é infundida em um único lado, logo a neurodegeneração ocorre somente em um lado do cérebro, já a bilateral possui infusão nos dois lados do cérebro tendo perda dopaminérgica em ambos os lados. Além disso, existem algumas regiões onde a 6-OHDA pode ser infundida, as mais utilizadas são a do estriado e feixe prosencefálico medial, representando mais de 60% dos estudos. A *substantia nigra* também é muito usada (PRATES-RODRIGUES *et al.*, 2025). Mesmo quando as lesões são na região, eles apresentam inúmeras variações de coordenadas estereotáxicas, com cada laboratório tendo a sua. Dessa forma, não existe um padrão, com muitos grupos de pesquisalaboratórios possuindo seu próprio protocolo cirúrgico (PRATES-RODRIGUES *et al.*, 2025). Para a reprodução dos sinais não-motores, normalmente é necessário um ajuste de dose, já que a dose precisa ser menor que a utilizada visando os sinais motores da doença. Dessa forma, o protocolo motor muitas vezes não vai poder ser reaplicado (Masini 2021), tendo em vista que o grau de neurodegeneração no estriado e *substantia nigra* é dose dependente (CUI *et al.*, 2024).

Em relação a sinais não-motores, a 6-OHDA é capaz de reproduzir uma grande variedade deles, como já mencionado (Tabela 3). O sinal mais analisado no modelo são questões cognitivas principalmente memória, tendo em vista alta presença um sinal presente em pacientes de Parkinson com a DP. Nesse sentido, a toxina conseguiu de causar déficit na memória espacial no teste de reconhecimento de local novo (TRON) (XIE; PRASAD, 2020). Além disso, também foi observado déficit na memória de novidade em modelos de lesão bilateral estriatal. Por meio do TRON, que consiste na apresentação de um objeto familiar durante a fase de habituação e na apresentação de um objeto novo no momento do teste. Caso o animal esteja saudável, ele irá mostrar preferência pelo objeto novo. Animais que apresentaram déficit cognitivo não são capazes de distinguir entre os objetos tanto em testes de memória de curto prazo, com espaço entre a habituação e o teste de até 2 horas (BONITO-

OLIVA *et al.*, 2014) , quanto em testes de memória de longo prazo, onde a diferença é de 24 horas (MASINI *et al.*, 2018). A 6-OHDA também foi capaz de gerar déficits relacionados a aprendizagem nos testes de labirinto aquático de Morris (YANG *et al.*, 2020) e labirinto de Barnes (BETANCOURT *et al.*, 2017).

Em relação à reprodução de comportamentos ansiosos, o modelo de 6-OHDA se mostra capaz de reproduzi-los. A principal forma que estudos avaliam o comportamento é por meio do teste do labirinto em cruz elevado (LCE) (CHEN *et al.*, 2014; CUI *et al.*, 2024). O comportamento também pode ser avaliado com o tempo passado no centro do teste do campo aberto (OF). O OF é o teste comportamental mais utilizado no modelo de 6-OHDA, sendo usado para avaliar atividade motora espontânea (PRATES-RODRIGUES *et al.*, 2025).

Sinais de depressão também podem ser observados em estudos com 6-OHDA. Normalmente apatia, anedonia, falta de esperança e desespero são os comportamentos apresentados. O teste de nado forçado avalia apatia, falta de esperança e desespero e, o teste de preferência por sucrose avalia anedonia (PRATES-RODRIGUES *et al.*, 2025).

Muitos distúrbios do sono podem ser replicados nesse modelo, como fragmentação do sono, redução do sono REM, lapsos de sono NREM (HUNT *et al.*, 2022). Dessa forma, o modelo de 6-OHDA pode ser usado para análises com disfunções circadianas. As avaliações foram feitas por eletroencefalograma (EEG) e eletromiografia com o auxílio de eletrodos implantados nos animais (MEDEIROS *et al.*, 2023).

2. OBJETIVOS

2.1.Objetivos gerais

Avaliar os efeitos antiparkinsonianos (sinais motores e não-motores) e a toxicidade do peptídeo nanoencapsulado Fraternina-10 em um modelo experimental da Doença de Parkinson. Para tanto, foi realizada a padronização de um modelo da Dp em camundongos com a presença de sinais não-motores.

2.2.Objetivos específicos

- Formular a nanopartícula encapsulando o peptídeo Fraternina-10.
- Atestar a estabilidade dos aspectos físico-química da nanoformulação, formada pela junção da nanocápsula e da Fraternina-10 (NF-10).
- Analisar a toxicidade do NF-10 e da Fraternina-10 livre em protocolo de dose única.
- Avaliar a histopatologia do NF-10 e da Fraternina-10 livre no protocolo de dose única.
- Padronizar os objetos utilizados no teste de reconhecimento de objeto novo (TRON).
- Encontrar uma dose de 6-OHDA capaz de gerar sinais não-motores.
- Avaliar a capacidade do protocolo de 6-OHDA unilateral de gerar sinais tipo ansioso nos animais.
- Avaliar a capacidade do protocolo de 6-OHDA unilateral de gerar déficits cognitivos no TRON.
- Avaliar o efeito terapêutico da NF-10 nos sinais tipo ansioso e nos déficits cognitivos.

3. METODOLOGIA

3.1. Nanopartícula

3.1.1. Produção da nanopartícula

Para a realização desse trabalho foi utilizado o peptídeo Fraternina-10. Ele foi adquirido da empresa Biointech utilizando a técnica de síntese em fase sólida para sua síntese. A pureza do peptídeo foi averiguada por meio de cromatografia líquida de alta pressão (Anexo A). Sendo assim, foi produzida uma nanopartícula lipídica com núcleo líquido do tipo nanocápsula (NLC), a partir do protocolo modificado de Ombredane et al. (2020) (OMBREDANE *et al.*, 2020). Ela é constituída por uma base de oligossacarídeo lactato de quitosana (OLQ) (523682, Sigma Aldrich®) e lecitina (Lipoid E 80, Lipoid®) para muco adesão. A lecitina foi utilizada como surfactante da nanoestrutura. Foram constituídas duas formulações, a primeira foi uma nanopartícula branca (NB) (Figura 8 A) composta somente pelos elementos da nanocápsula, estando vazia, ou seja, apenas o carreador. Já a segunda nanopartícula foi formulada encapsulando o peptídeo Fraternina-10 (NF-10) (Figura 8 B).

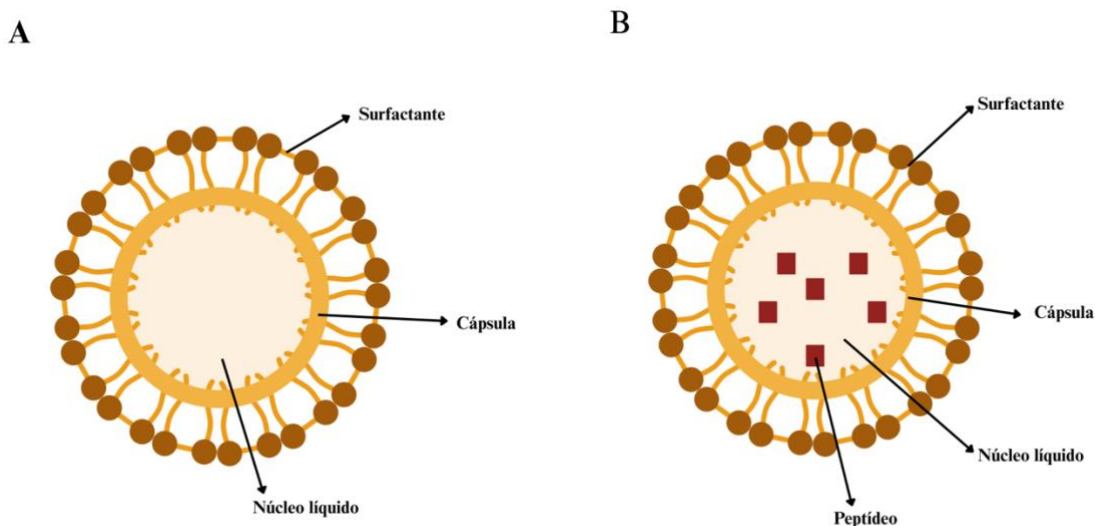


Figura 8. Nanoformulações produzidas do tipo nanopartícula lipídica com o núcleo líquido, do tipo nanocápsula. (A) Nanopartícula branca composta somente pela estrutura da nanopartícula sem carrear o peptídeo. (B) Nanopartícula envelopando o peptídeo Fraternina-10. Figura desenvolvida com Biorender.

Anterior à preparação das nanoformulações, todos os utensílios necessários foram esterilizados, utilizando uma autoclave. Posteriormente, todos os substratos foram quantificados em uma balança de precisão e separados para a realização das nanoformulações (Tabela 4).

Tabela 4. Composição das nanoformulações produzidas.

Nanoformulações	Composição
Nanopartícula Branca (NB)	388,8 mg de lecitina+ 194,4 mg óleo de oliva+ 25,2 mg de oligossacarídeo lactato de quitosana + 6 mL de PBS
Nanopartícula + Fraternina-10 (NF-10)	388,8 mg de lecitina + 194,4 mg óleo de oliva + 25,2 mg de oligossacarídeo lactato de quitosana + 6 mL de PBS + 12 mg Fraternina-10

No processo de produção da estrutura lipídica revestida pelo surfactante (lecitina), foram colocados em tubo de 50mL, 388,8 mg de lecitina (Lipoid E 80, Lipoid®), 194,4 mg óleo de oliva (óleo de oliva Extra virgem, Gallo Portugal®) e 12 mg de Fraternina-10 (no caso da NLC). Em seguida, foi adicionado 6 mL de álcool etílico e a solução resultante foi agitada em um agitador tipo vórtex até estar visualmente homogênea, assim sendo transferida para um balão de fundo redondo. Visando a evaporação do etanol, foi utilizado um rotaevaporador com temperatura por volta de 60-70 °C e pressão a 50 mBar, durante 30-40 minutos a depender da formação que forma a cápsula e evaporação total do álcool etílico. O processo de formulação para ambas as formulações é idêntico exceto pela ausência do peptídeo encapsulado na NB (Figura 9).

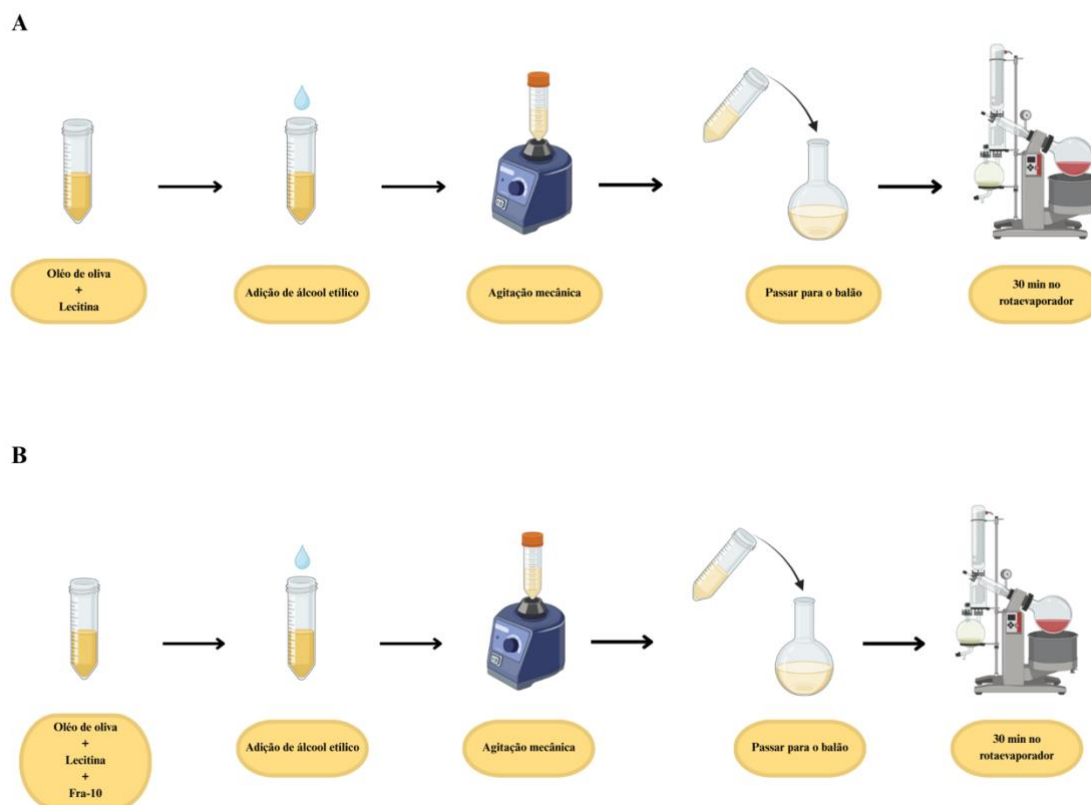


Figura 9. Processo de formação da nanocapsula. (A) Formulação da nanopartícula branca (NB). (B) Formulação da nanopartícula + Fraternalina-10 (NF-10). Figura desenvolvida com Biorender.

Após a formação do revestimento, OLQ foi diluída em tampão fosfato salino (PBS) e passou por uma agitação mecânica até a sua homogeneização. Em seguida, a solução foi transferida ao balão onde se encontra a matriz sólida lipídica. Foi utilizado um *cellscraper* para descolar a matriz do balão e juntá-la com a solução de OLQ em solução salina tampão com fosfato (do inglês Phosphate-buffered saline - PBS). Depois da matriz estar descolada, essa nova solução foi transferida para um tubo falcon de 50mL e foi agitada mecanicamente visando uma melhor homogeneidade da solução. Com a solução homogênea, ela foi posta em um sonicador em banho de gelo durante 30 minutos com pulso contínuo com 40% de amplitude. Após esse período, a formulação estava completa (Figura 10).

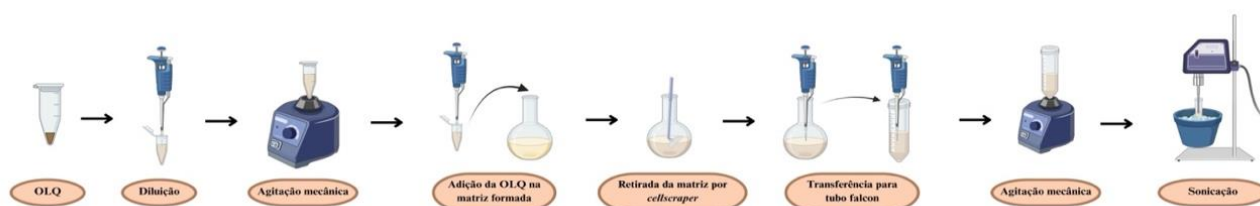


Figura 10. Formulação da nanopartícula lipídica líquida, do tipo nanocápsula. Figura desenvolvida com Biorender.

Após a formulação de ambas as nanopartículas, foram feitas alíquotas de 120 μL para sua caracterização físico-química. Todas as amostras utilizadas, tanto para análise físico-química quanto para tratamento, foram armazenadas a 4 $^{\circ}\text{C}$.

3.1.2. Análise Físico-Química

Visando averiguar a estabilidade da nanopartícula, foi analisada seus aspectos físico-químicos por 120 dias. As análises foram feitas nos dias 1, 7, 15, 30, 90, 120, sendo considerado o dia 0, o dia da sua formulação (Figura 11).

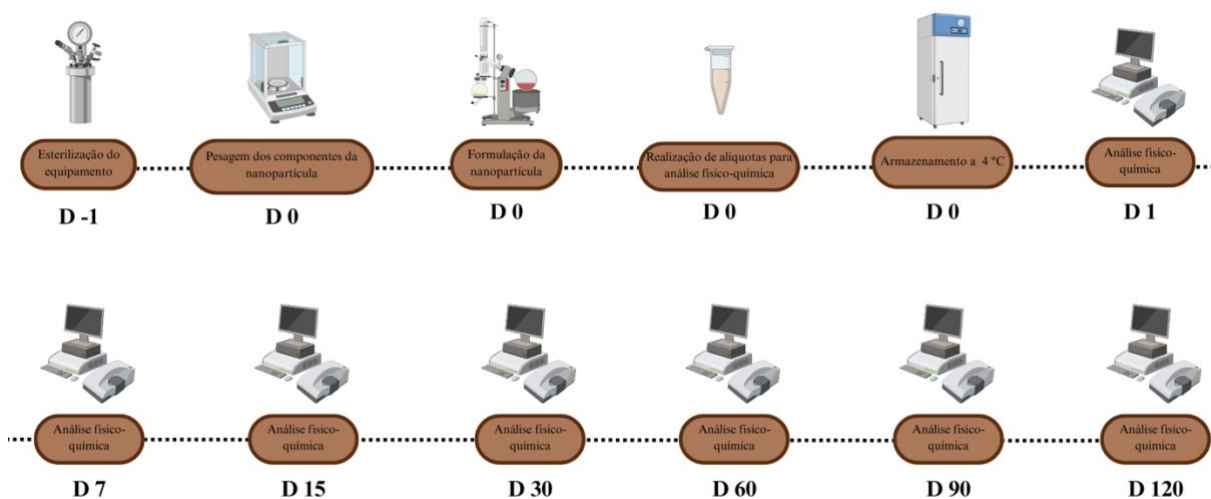


Figura 11. Esquema temporal de formulação, armazenamento e caracterização das nanopartículas.

Para a análise das características físico-químicas foi utilizada a técnica de espalhamento dinâmico de luz por meio do instrumento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern® Instruments, Ltda). Foram medidos o índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico médio. Foram feitas duas análises diferentes no equipamento, uma de tamanho e outra de Potencial Zeta. Sendo assim, para a leitura a alíquota da nanoformulação, a amostra foi diluída em 1080 μ L de PBS. Primeiramente, foi medido o potencial hidrogeniônico (pH) da nanopartícula utilizando uma fita indicadora de pH. Em seguida, foi colocada em uma cubeta (DTS0012) (Figura 12 A) para a análise do tamanho da nanopartícula, com as seguintes conformações para a leitura, 10 corridas feitas em triplicata, temperatura a 25 °C com 30 segundos de tempo de equilíbrio e análise em resolução normal (Figura 12 C). Após a análise de diâmetro hidrodinâmico, a amostra foi transferida para uma cubeta (DTS1070) (Figura 12 B) para a realização da análise de Potencial Zeta, seguindo as conformações de leituras da análise de tamanho (Figura 12 C).

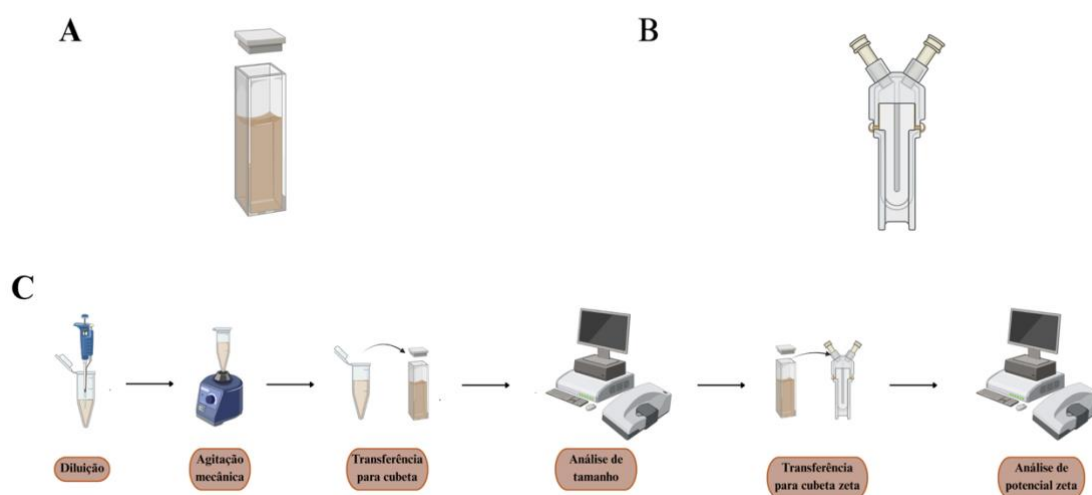


Figura 12. (A) Cubeta (DTS0012) utilizada na análise de diâmetro hidrodinâmico. (B) Cubeta (DTS1070) utilizada na análise de potencial zeta. (C) protocolo de análise das características físico-químicas no Zetasizer Nano ZS90. Figura desenvolvida com Biorender.

Para a análise morfológica da nanopartícula foi utilizada a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para a realização da microscopia foi necessário diluir 1 µl das nanopartículas em 300 µl de solução de isopropanol e água deionizada 50% (v/v).

3.2. Sujeitos experimentais e aspectos éticos

Para os experimentos *in vivo*, a pesquisa foi realizada de acordo os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e em concordância com a Lei Arouca (Lei 11.794/2008), que regulamenta o uso de animais para fins de pesquisa científica. Dessa forma, nesse estudo foram utilizados camundongos machos *Swiss mus musculus*. A Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (UnB), aprovou este projeto sob protocolo nº 23106.017341/2024-17 (Anexo B) e sob protocolo nº 032/2020 (Anexo C). A fase *in vivo* do projeto foi dividida em duas partes, a do protocolo toxicológico e a do protocolo não-motor da DP. Nesse sentido foram utilizados 96 animais no total, incluindo todos os ensaios.

3.3. Análise Toxicológica

3.3.1. Protocolo

Os ensaios de toxicidade de dose única foram feitos de acordo com GUIA PARA A CONDUÇÃO DE ESTUDOS NÃO CLÍNICOS DE TOXICOLOGIA E SEGURANÇA FARMACOLÓGICA NECESSÁRIOS DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS desenvolvido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), versão 2 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013). De acordo com o guia é possível executar dois estudos para averiguar sua toxicidade e segurança, o protocolo de administração de dose única (PADU) e o protocolo de administração de dose repetida (PADR). Nesse trabalho somente estudos de dose única foram feitos, nesse protocolo os animais receberam o tratamento uma única vez e foram observados por 14 dias.

Sendo assim, os seguintes grupos experimentais foram feitos, o controle negativo que recebeu solução salina, a nanopartícula branca (NB) o qual recebeu somente a nanoestrutura sem a presença do peptídeo e os 3 grupos do peptídeo nanoencapsulado pela nanopartícula (NF-

10) em diferentes doses, 5 µg/animal de Fra-10 envelopados na nanopartícula administrados em um volume de 5 µL, 10 µg/animal de Fra-10 envelopados na nanopartícula administrados em um volume de 5 µL, 20 µg/animal de Fra-10 envelopados na nanopartícula administrados em um volume de 10 µL. Por último, 3 grupos do peptídeo livre diluído em salina, 5 µg/animal de Fra-10 diluída em 5µL de salina, 10 µg/animal de Fra-10 diluída em 5 µL salina, 20 µg/animal de Fra-10 diluída em 10 µL salina (Tabela 5). Os tratamentos foram administrados por via intranasal, por meio de uma agulha conectada a um fio ligada a uma seringa Hamilton (700 series, Microliter #750 Luer Tip (LT) Syringe). Para administração, os animais eram sedados por meio do anestésico Isoflurano.

Tabela 5. Grupos experimentais do protocolo de toxicidade.

Grupo Experimental	Tratamentos	Volume
Veículo (n=8)	solução salina a 150nM	5µL
Nanopartícula Branca (n=8)	5 µL/animal da nanopartícula lipídica	5µL
Fraternina-10 (5 µg) + Nanopartícula (n=8)	5 µg/animal de Fraternina-10 envelopada pela nanopartícula	5µL
Fraternina-10 (10µg) + Nanopartícula (n=8)	10 µg/animal de Fraternina-10 envelopada pela nanopartícula	5µL
Fraternina-10 (20µg) + Nanopartícula (n=8)	20 µg/animal de Fraternina-10 envelopada pela nanopartícula	10µL
Fraternina-10 (5µg) Livre (n=8)	5 µg/animal de Fraternina-10 diluída em salina	5µL
Fraternina-10 (10µg) Livre (n=8)	10 µg/animal de Fraternina-10 diluída em salina	5µL
Fraternina-10 (20µg) Livre (n=8)	20 µg/animal de Fraternina-10 diluída em salina	10µL

Durante os 14 dias, foram observados a massa corporal e sua coordenação motora por meio do teste de equilíbrio motor no cilindro rotatório (Rotarod). Os ensaios foram feitos duas vezes ao decorrer do protocolo, no primeiro dia e no décimo quarto dia (Figura 13). Além disso, foi realizada uma pesagem diária dos animais, visando monitorar a sua massa corporal.

Protocolo Toxicidade

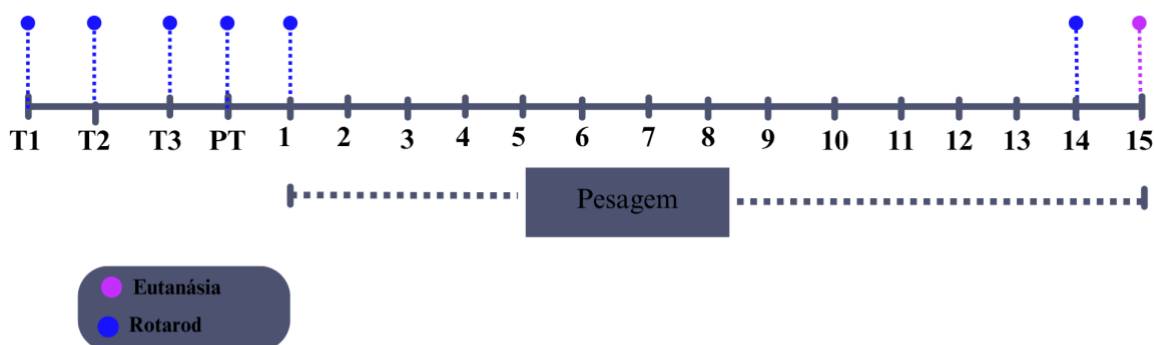


Figura 13. Esquema do protocolo de toxicidade de dose única e testes comportamentais utilizados. Pontos azul representam dias com o desafio no teste do Rotarod e o ponto rosa representa a eutanásia dos animais.

3.3.2. Ensaio comportamentais

Visando analisar coordenação motora dos animais, o segundo teste utilizado foi o cilindro rotatório (Rotarod). O aparato do teste possui um cilindro rotatório com velocidade regulável e é dividido em 5 baias individuais onde os animais são colocados (Figura 15). No Rotarod é medida a latência de queda dos animais, averiguando possível toxicidade influenciando a habilidade motora do animal.

Os animais são colocados no cilindro cada um em uma baia, todos virados para o fundo do aparato. O teste possui a duração de 5 minutos, tendo seu início assim que o cilindro começa a girar, com a velocidade de 4 rotações por minuto (RPM) e sua rotação aumentava de forma progressiva chegando até 40 RPM. Dessa forma, foi analisada a latência de queda de cada animal, caso o animal não caísse era computado a latência de 300 segundos, considerado o tempo máximo do teste.

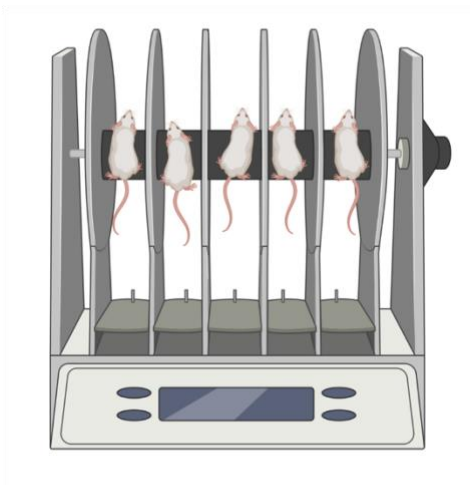


Figura 14. Imagem do teste do Rotarod utilizado no protocolo de dose única. Figura desenvolvida com Biorender.

Por último, a massa corporal dos animais foi acompanhada diariamente durante a totalidade do protocolo. Para averiguar a flutuação da massa de cada animal foi feito um índice de variação de massa (IVM). O IVM é calculado da seguinte forma, a massa final menos a massa inicial do animal dividido pela massa final.

3.3.3. Eutanásia, coleta e armazenamento dos órgãos

Após os 14 dias de protocolo, os animais foram eutanasiados por overdose de Tiopental (60 mg/kg, via i.p.). Os seguintes órgãos foram retirados, pulmão, rim, fígado e encéfalo. Com exceção do encéfalo, a massa e o volume de cada órgão foram medidos. A massa foi registrada em uma balança analítica (Tecnal) e seu volume foi calculado através de um pletismômetro (Bonther). Depois da retirada dos órgãos eles foram transferidos para uma solução de formaldeído a 4% em PBS onde permaneceram por 24 horas armazenados a 4°C para maior fixação do tecido. Em seguida, eles foram retirados dessa solução e colocados em uma solução de sacarose 30% em PBS por 48 horas visando a desidratação dos órgãos, eles continuaram armazenados na temperatura de 4°C para que o tecido fosse crioprottegido, prevenindo a perda da sua citoarquitetura. Por último, após esse procedimento os órgãos estavam prontos para congelamento, onde eles foram imersos em isopentano por 20 segundos, em seguida

embrulhados em papel alumínio devidamente identificado e armazenados em um congelador a -80 °C.

3.3.4. Histologia

Após o congelamento, os órgãos foram seccionados em um criostato (Leica CM1850) em fatias de 50 µM de espessura, utilizando o meio de inclusão Tissue-Tek® (Sakura®). As secções foram selecionadas, coletadas por um pincel e transferidas para uma placa de 24 poços contendo solução *antifreezing* (30% de etilenoglicol, 30% de glicerina e 40% de água destilada). Primeiramente, antes das lâminas receberem os cortes, elas foram gelatinizadas com uma solução de gelatina em pó (Vetec Química Fina, Sigma-Aldrich) e sulfato de cromo potássico (Divisione Chimica Industriale - Milano), 3 cortes foram dispostos em cada lâmina. Em seguida, as lâminas montadas foram secas em estufa a 37°C por 24 horas.

Visando a identificação de anomalias morfológicas como tumores, necroses e hemorragias, foi utilizada a coloração de Hematoxilina-eosina (H.E.). Todo o processo de coloração H.E. foi realizado em uma capela de fluxo laminar após a secagem das lâminas. As lâminas foram inicialmente imersas em água destilada por 10 segundos. Em seguida, foram submersas na solução de hematoxilina de Harris, com tempos de permanência ajustados de acordo com o tipo de tecido e o estado do corante, que é fotossensível.

Logo depois, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada, seguidas por imersão em solução diferenciadora contendo água destilada e hidróxido de amônio (NH₄OH), e novamente em água destilada. Esse mesmo processo foi novamente com solução de ácido clorídrico (HCl). Em seguida, as lâminas foram submersas em solução de eosina-floxina por cerca de 1 minuto, podendo variar para cada tipo de tecido e da degradação do corante. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada, depois foram realizadas imersões em soluções de etanol em concentrações crescentes (50%, 70%, 90% e 100%). Por último, as lâminas foram submersas em xilol (Dinâmica®, Brasil) por 90 s duas vezes. Anterior a utilização dos corantes ambos foram filtrados para remoção de impurezas. Finalmente, após a coloração das lâminas, elas foram montadas com lamínulas de vidro (Exacta, Brasil) usando Entellan® (Merck KGaA®, Alemanha) como meio de montagem.

A análise morfológica foi realizada por meio de um microscópio óptico (Leica DM2000), fotos foram tiradas das lâminas utilizando uma câmera digital (Leica DFC 310 FX) acoplada ao microscópio, que também possui um software de captura de imagens (Leica, Las V4.1.0).

3.4. Sinais não-motores no modelo de DP em camundongos

3.4.1. Padronização do modelo

Tendo em vista a necessidade de estabelecer um modelo de sinais não-motores da DP no Laboratório de Neurofarmacologia da UnB, foi necessário realizar a padronização de um novo protocolo. Sendo assim, a dose da neurotoxina 6-OHDA foi estabelecida, além disso, foram avaliados quais sinais eram reproduzíveis com o protocolo cirúrgico padrão do laboratório. Somente após estabelecer esses parâmetros, o peptídeo envelopado pela nanopartícula foi testado.

3.4.2. Neurocirurgia

Visando replicar os sinais não-motores da DP, foi realizada uma cirurgia estereotáxica com lesão de forma unilateral, com uso do composto neurotóxico 6-OHDA (Sigma-Aldrich®) na região do estriado.

Anterior ao procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados por meio da via intraperitoneal (I.P.) com a Acepromazina (2,5 mg/kg i.p; Vetnil), após 15 minutos foram administrados cloridato de quetamina (75 mg.Kg-1; Ceva, Brasil) e cloridato de xilasina (15 mg.Kg-1; Ceva, Brasil) diluídos em solução fisiológica (150 mM). Em seguida, os animais foram fixados em um estereotáxico (Insight Equipamentos®, Brasil) para que o procedimento cirúrgico fosse iniciado. Posteriormente, foi administrada uma injeção local de lidocaína (30 mg.mL-1, Dentsply Pharmaceutical, Brasil), depois foi feita a assepsia do local com iodopolividona 10% (Vic Pharma®, Brasil), para que então pudesse ser realizada a tricotomia da cabeça expondo o crânio do animal, para que ele estivesse pronto para as medições estereotáxicas. A região alvo do estriado foi estimada por meio do bregma como referência, nas seguintes coordenadas, AP (anteroposterior): +0.4mm, ML (mesolateral): -1,8mm e DV

(dorsoventral): -3.5mm, de acordo com o Atlas Estereotático de Paxinos e Franklin (2001). Para a infusão foi utilizada uma agulha de 0,3 mm de diâmetro acoplada a uma bomba de infusão. Dessa forma, foi infundida a 6-OHDA (Sigma®) (10µg base livre/µL em solução salina 0,9% e ácido ascórbico 0,2%) a uma taxa de 0,5µl por minuto. Para garantir que o conteúdo não extravase e fosse difundido na sua totalidade no estriado, a agulha permaneceu por mais 3 minutos após a infusão.

Posteriormente, foi feita uma sutura fechando o corte feito na pele do animal, depois foi aplicada um antimicrobiano tópico para melhor cicatrização e prevenção de infecção. Após a cirurgia os animais receberam 200 µL de salina glicosilada durante 4 dias por via parenteral. Além disso, foi dado aos animais suplementação alimentar e ração macerada com água para facilitar a alimentação deles, por via enteral. Essas provisões foram feitas com o objetivo de evitar desnutrição e reduzir a mortalidade após cirurgia.

3.4.3. Padronização da dose da neurotoxina

A partir de uma mesma solução de 6-OHDA (Sigma®) (10 µg base livre/µL em solução salina 0,9% e ácido ascórbico 0,2%), foram testados dois volumes diferentes de 6-OHDA, visando avaliar qual reproduziria os sinais não-motores avaliados. A concentração de ambos os volumes é a mesma de 6-OHDA (Sigma®) (10µg base livre/µL em solução salina 0,9% e ácido ascórbico 0,2%). Como primeiro teste, foi usado o volume padrão do laboratório de 4 µL (40 µg/animal), que reproduz perda motora severa nos animais (Avohay, 2016). Um volume menor de 3 µL (30 µg/animal) foi estabelecido, visando uma lesão mais parcial da *substantia nigra* e estriado. Sendo assim, foram utilizadas duas doses de 6-OHDA, 40 µg/animal e 30 µg/animal, no mesmo protocolo cirúrgico, utilizando as mesmas coordenadas e a mesma taxa de infusão.

3.4.4. Protocolo experimental de 15 dias

Visando avaliar os sinais não-motores que a lesão era capaz de reproduzir, foi estabelecido um protocolo com duração de 15 dias, sendo o dia do procedimento cirúrgico considerado o dia 0. O objetivo do protocolo primeiramente era a avaliar se houve sinais não-motores após a

administração da 6-OHDA em duas doses, em relação ao grupo veículo. Sendo assim, nesse período foram feitos testes comportamentais avaliando comportamentos do tipo ansioso, a memória de longo prazo e a mobilidade dos animais. Os testes comportamentais foram feitos nos dias 12 a 15 do protocolo, na seguinte ordem: labirinto em cruz elevado, campo aberto e teste de reconhecimento de objeto novo.

Após isso, uma dose de 6-OHDA foi determinada e sua capacidade de reproduzir sinais não-motores avaliada. Em seguida, a avaliação terapêutica da NF-10 foi feita. Nesse protocolo, o grupo NF-10 foi analisado em relação aos grupos veículo e 6-OHDA 30 µg/animal (Tabela 6). O grupo veículo foi infundido com somente a solução veículo no volume de 3 µL. O grupo tratamento com NF-10 (10 µg/animal) foi feito posteriormente após a padronização, sendo infundido com a dose de 6-OHDA de 30 µg/animal, os animais foram tratados todo dia durante o período de 15 dias e passaram pelo mesmo protocolo (Figura 16). Todos os ensaios foram gravados por uma câmera digital (Intelbras) e analisados pelo software Anymaze (Stoelting Co., USA).

Tabela 6. Grupos experimentais do protocolo de sinais não-motores em um modelo da DP em camundongos.

Grupo Experimental	Infusão
Veículo (n=8)	solução salina 0,9% e ácido ascórbico 0,2%
6-hidroxidopamina (6-OHDA) 30 µg (n=8)	3µL de 6-hidroxidopamina (10 µg base livre/µL em solução salina 0,9% e ácido ascórbico 0,2%)
Fraternina-10 (10µg) + Nanopartícula (n=8)	3µL de 6-hidroxidopamina (10 µg base livre/µL em solução salina 0,9% e ácido ascórbico 0,2%)

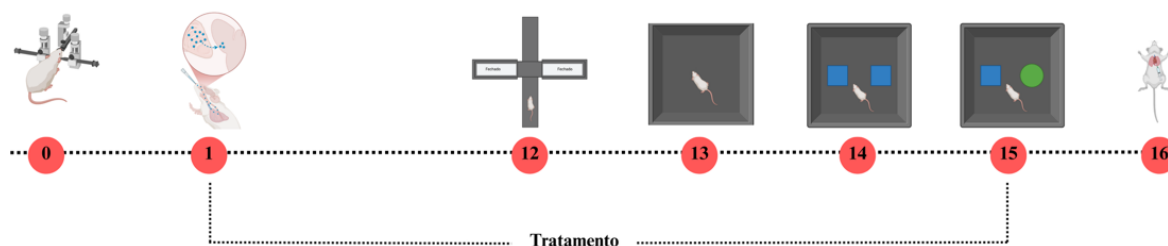


Figura 15. Esquema temporal do protocolo de sinais não-motores da DP em camundongos. Dia 0, sendo o dia da cirurgia estereotáxica, dia 1-15 tratamento pela via intranasal, dia 12 teste do Labirinto em cruz elevado, dia 13 o teste do campo aberto, dia 14 habituação do TRON, dia 15 o teste de reconhecimento de objeto e dia 16 a eutanásia dos animais.

3.4.5. Testes Comportamentais

3.4.5.1. Labirinto em Cruz Elevado

Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um teste muito utilizado para a avaliação de comportamentos do tipo ansioso ([Lister, 1987](#)). O aparato é composto por 4 braços, sendo dois deles fechados por paredes e dois abertos (Figura 17), com todos possuindo 10 cm de largura, comprimento de 50 cm em cada braço e 55 cm de altura para o chão. Tendo em vista, a tendência dos camundongos de ficarem em ambientes fechados, à proporção que o animal passa em cada tipo de braço determina seu nível de ansiedade. Nesse teste, foram analisadas as porcentagens de tempo passado em cada tipo de braço (aberto e fechado), calculado da seguinte forma para os braços abertos: tempo total nos braços abertos dividido pelo tempo total em todos os braços, para os braços fechados: o tempo total nos braços fechados dividido pelo tempo total passado em todos os braços multiplicado por 100.

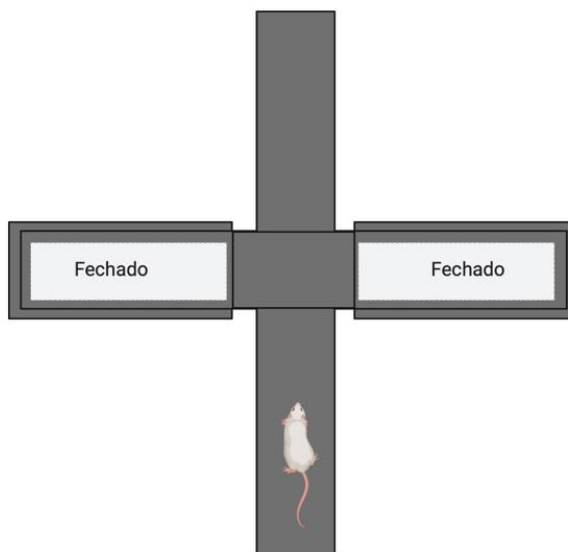


Figura 16. Teste do labirinto em cruz elevado, utilizado no protocolo como indicador de comportamentos ansiosos.

3.4.5.2. Teste do campo aberto – Open Field

Visando avaliar aspectos de movimentação espontânea e habituar o animal para o teste do TRON, foi feito o teste do campo aberto. A arena do teste possui formato quadrado medindo 40 x 40 cm (Figura 18). O aparato possui cor preta tanto no fundo quanto em suas paredes. Nesse teste, foram avaliados os seguintes fatores, distância total percorrida, velocidade média e tempo total imóvel.



Figura 17. Teste do campo aberto quadrado, utilizado no protocolo como indicador de mobilidade.

3.4.5.3. Análise de déficits cognitivos pelo TRON

O Teste de Reconhecimento de Objeto Novo (TRON) é um teste de memória, que se baseia na preferência do camundongo por novidade (DENNINGER; SMITH; KIRBY, 2020). Nesse teste, foi avaliada a memória de longo prazo, sendo dividido em dois dias, o de habituação e o de teste (Figura 19). Primeiramente, o animal é colocado na arena com dois objetos idênticos e é permitido andar livremente por 5 minutos. Os objetos estão no centro da arena e a 10 cm da parede do lado que ele se encontra. No dia seguinte (24 h), um dos objetos familiares é trocado por um objeto novo, que o animal nunca interagiu. Dessa forma, o teste consiste em avaliar interação do animal com o objeto novo e o familiar. A porcentagem de tempo total que o animal passou interagindo com cada objeto foi avaliada, sendo considerado interação somente se o focinho do animal estava virado para o objeto em um raio de 3 cm.



Figura 18. Teste de reconhecimento de objeto novo utilizado no protocolo como indicador de memória de longo prazo. Habituação ao objeto familiar e 24 horas depois um dos objetos é trocado por um objeto novo.

3.4.5.4. Eutanásia, perfusão transcardíaca e retina dos encéfalos

Ao fim do protocolo, os animais passaram pela eutanásia por overdose de Tiopental (60 mg/kg, via i.p.). Foi checado caso o animal ainda sentia dor pelos reflexos e retirada dos membros, verificando a profundidade da anestesia, então foi feita uma perfusão transcardíaca.

A caixa torácica do animal foi aberta e o coração foi perfundido por 10 mL de PBS, visando a remoção do sangue. Em seguida, foi perfundido no mesmo local com 10 mL de formol para melhor fixação do encéfalo.

Após a perfusão, foi feita remoção do encéfalo, que foi emergido em solução de formaldeído a 4% em PBS por 24 horas e armazenado em a 4 °C. Ao fim das 24 horas, eles foram colocados em uma solução de sacarose 30% em PBS por 48 horas visando a desidratação dos órgãos, novamente armazenados na temperatura de 4°C para que o tecido fosse crioprottegido, prevenindo a perda da sua citoarquitetura. Finalmente, os encéfalos foram congelados sendo emergidos em isopentano por 20 segundos, em seguida, forma embrulhados em papel alumínio e armazenados em um congelador a -80 °C.

3.4.5.5. Imuno-histoquímica

Após o congelamento, os órgãos foram seccionados em um criostato (Leica CM1850) em fatias de 50 µM de espessura, utilizando o meio de inclusão Tissue-Tek® (Sakura®). As seções foram selecionadas, coletadas por um pincel e transferidas para uma placa de 24 poços contendo solução *antifreezing* (30% de etilenoglicol, 30% de glicerina e 40% de água destilada). Primeiramente, antes das lâminas receberem os cortes elas foram gelatinizadas com uma solução de gelatina em pó (Vetec Química Fina, Sigma-Aldrich) e sulfato de cromo potássico (Divisione Chimica Industriale - Milano), 3 cortes foram dispostos em cada lâmina. Em seguida as lâminas montadas foram secas em estufa a 37°C por 24 horas.

Para a análise da degradação dopaminérgica foram feitas marcações com tirosina hidroxilase, visando marcar neurônios dopaminérgicos. Primeiramente, os cortes foram lavados em PBS durante 10 minutos 3 vezes, após, eles passaram 1 hora em agitação constante emergidos em uma solução composta por PBS com 0,8% Triton X-100, 1% albumina sérica bovina (BSA), 10% leite desnatado em pó Molico®, 15% de glicina 0,3 M e 0,1% Tween-20. Então os cortes foram incubados com o anticorpo primário policlonal anti-tirosina hidroxilase produzido em coelho (Invitrogen, OPA1-04050) sob agitação constante overnight. Ao fim da incubação do anticorpo primário os tecidos foram lavados com PBS por 10 minutos 2 vezes. Em seguida, foram incubados por 2 horas sob agitação constante, em temperatura ambiente e no escuro, com o anticorpo secundário, policlonal anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo

Alexa Fluor® 488 produzido em cabra (Thermo, A11034), diluído a 1:500 em PBS contendo 1% de BSA. Os tecidos foram novamente lavados duas vezes com PBS por 10 minutos cada.

As lâminas foram montadas utilizando meio de montagem com DAPI (Sigma-Aldrich®). Foi aplicada uma gota do meio em cada um dos cortes e deixada 5 minutos em temperatura ambiente antes das lamínulas serem colocadas. Após a montagem das lâminas, elas foram armazenadas a 4°C sem contato com a luz até o momento da análise.

4. RESULTADOS

4.1. Nanoformulação

4.1.1. Diâmetro Hidrodinâmico

O diâmetro hidrodinâmico foi medido durante 120 dias, em ensaios em triplicata, visando analisar a variação de tamanho das nanoformulações, nanopartícula branco (NB) e nanopartícula associada a Fraternina-10 (NF-10) (Figura 20). Observou-se que a NF-10 apresentou um tamanho maior nos tempos avaliados a partir do D7. A análise estatística utilizada foi a ANOVA de duas vias. Diferença estatística foi observada entre os dias [F (6, 34) = 4,710; $p < 0,01$], além disso, também houve diferença estatística entre as nanoformulações [F (1, 34) = 56,32; $p < 0.0001$]. Em seguida, um teste de Tukey de comparação múltipla foi excetuado houve diferença estática entre as nanoformulações do mesmo dia durante todo o período de medição, dia 1 [$P < 0.0001$], dia 7 [$P < 0.0001$], dia 15 [$P < 0.0001$], dia 30 [$P < 0.0001$], dia 60 [$P < 0.0001$], dia 90 [$P < 0.0001$], dia 120 [$P < 0.0001$]. No entanto, nenhuma diferença foi observada durante os 120 dias comparando ambas as nanoformulações com elas mesmas [$p > 0.05$].

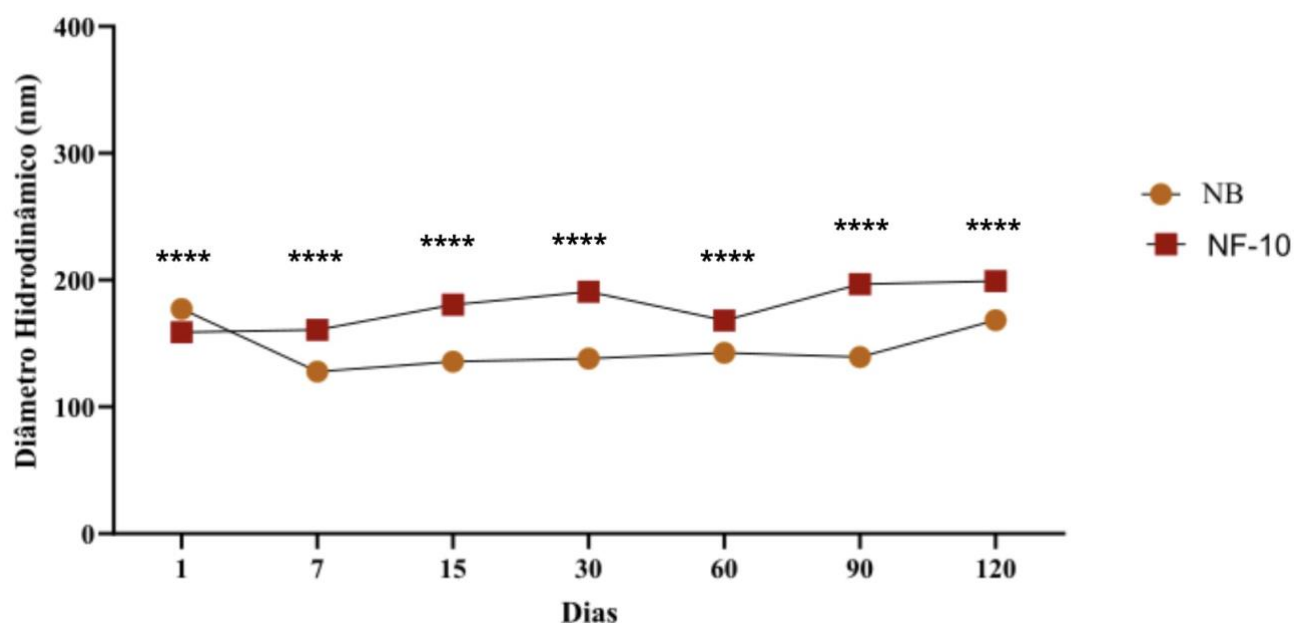


Figura 19. Diâmetro hidrodinâmico em nanômetros medido com a técnica de espalhamento dinâmico de luz utilizando o instrumento Zetasizer Nano ZS90, a medição foi feita nos seguintes dias, 1, 7, 15, 30, 60, 90 e 120. Os testes estatísticos utilizados foram ANOVA de duas vias e pós teste de comparações múltiplas de Tukey. (****) equivale $p < 0.0001$ em relação a nanopartícula branca (NB) no mesmo dia de análise da nanopartícula acoplada a Fraternina-10 (NF-10). Sendo assim, a diferença encontrada é comparando as nanoformulações em seus respectivos dias de medição, ou seja, NB e NF-10 do dia 1, NB e NF-10 do dia 7 e assim por diante.

4.1.2. Índice de Polidispersão

Outra análise realizada foi a medição do índice de polidispersão (PDI) pelo mesmo período de 120 dias, com as nanopartícula branca (NB) e nanopartícula associada a Fraternina-10 (NF-10) (Figura 21). As nanoformulações não apresentaram variações significativas de PDI durante todo período. A análise estatística usada foi a Anova de duas vias e como análise posterior foi feito um teste de Tukey de comparação múltipla. Nenhuma diferença estatística foi observada em relação aos dias [$F(6, 34) = 1,991$; $p > 0.05$] e nem entre as nanoformulações [$F(1, 34) = 0,06688$; $p > 0.05$].

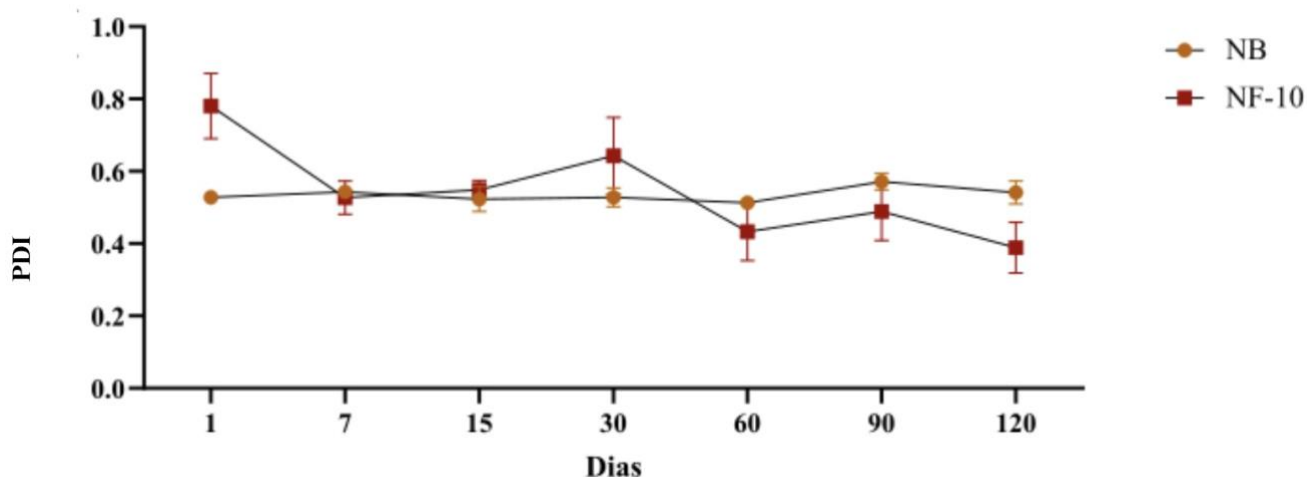


Figura 20. O índice de polidispersão (PDI) foi medido nos dias 1, 7, 15, 30, 60, 90 e 120 por meio do instrumento Zetasizer Nano ZS90. Foram testadas duas nanoformulações, nanopartícula branca (NB) e nanopartícula envelopando o peptídeo Fraternina-10 (NF-10). A análise estatística feita foi uma ANOVA de duas vias e um teste de TUKEY como análise múltipla.

4.1.3. Potencial Zeta

O Potencial Zeta (PZ) também foi medido para as nanoformulações NB e NF-10 utilizando o Zetasizer Nano ZS90 (Figura 22). As nanoformulações não apresentaram mudanças no PZ, mantendo uma carga razoavelmente neutra pelos 120 dias. Além disso, elas foram analisadas estaticamente da mesma forma, utilizando ANOVA de duas vias e teste de TUKEY como análise múltipla posterior. Nenhuma diferença estatística foi encontrada tanto entre as nanoformulações, NB e NF-10 [$F(1, 34) = 0,2838$; $p > 0.05$], quanto em relação aos dias [$F(6, 34) = 1.622$; $p > 0.05$]

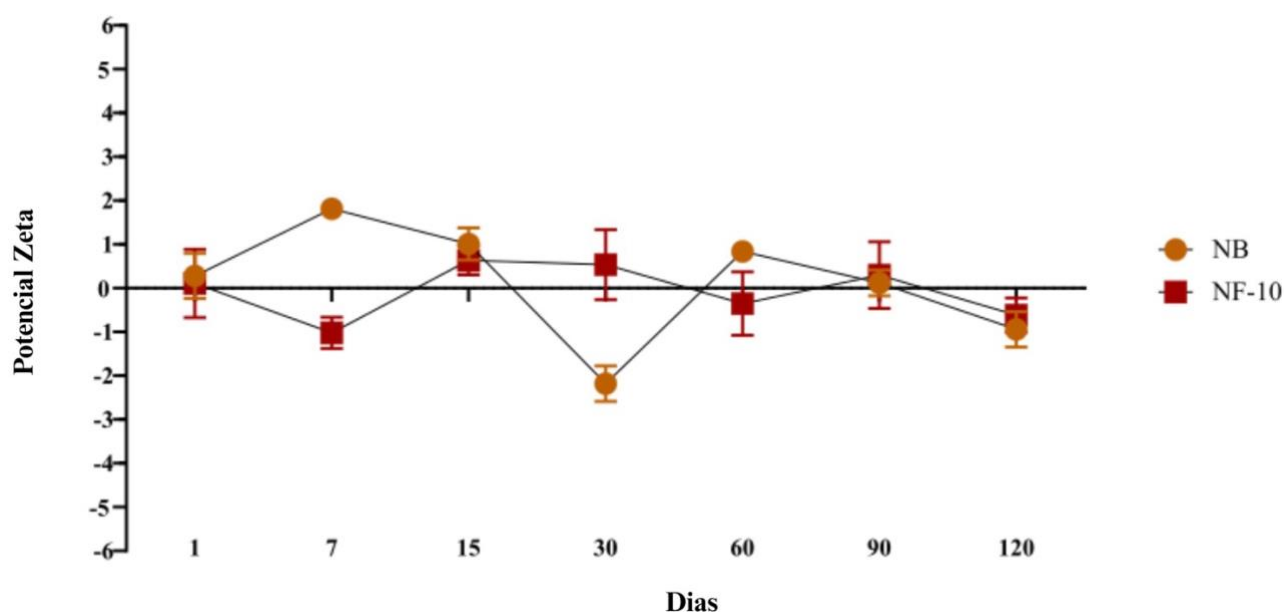


Figura 21. Potencial Zeta (PZ) foi medido com o Zetasizer Nano ZS90 nos dias 1, 7, 15, 30, 60, 90, 120. Duas nanoformulações foram testadas, nanopartícula branca (NB) e o peptídeo Fraternina-10 envolvido pela nanopartícula (NF-10). ANOVA de duas vias foi a análise estatística utilizada, em seguida, o teste de Tukey como comparação múltipla.

4.1.4. Potencial Hidrogeniônico

Como análise complementar o potencial hidrogeniônico (pH) foi medido utilizando uma fita indicadora de pH (Figura 23). O PH de ambas nanoformulações não demonstram nenhuma alteração se mantendo 6 durante todo o período. As medições foram feitas nos mesmos dias das análises no Zetasizer. Como análise estatística foi utilizado a ANOVA de duas vias, e teste de Tukey de comparação múltipla como análise posterior. Nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada entre os tratamentos [$F(1, 6) = 0$; $p > 0.05$]. Além disso, a não houve diferença significativa em relação aos dias [$F(6, 6) = 0$; $p > 0.05$].

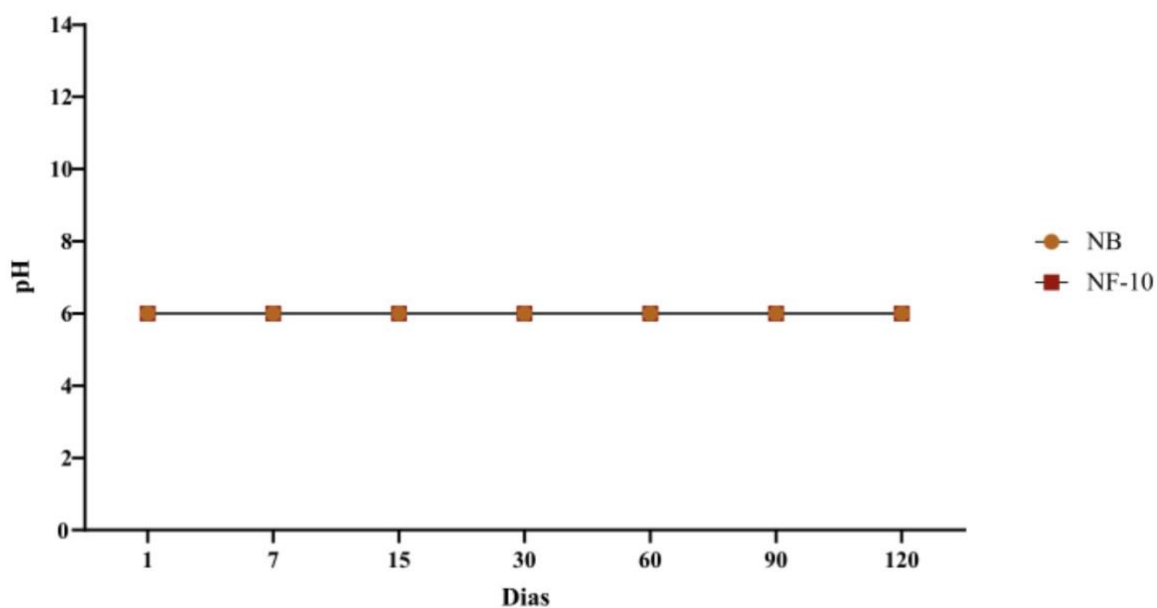


Figura 22. Potencial hidrogeniônico foi medido nos dias 1, 7, 15, 30, 60, 90 e 1200. Duas nanoformulações foram usadas, nanopartícula branca (NB) e nanopartícula envelopando o peptídeo Fraternina-10 (NF-10). Anova de duas vias foi a análise utilizada.

4.1.5. Análise das nanoformulações por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Análises com microscopia eletrônica de transmissão foram feitas visando avaliar as características morfológicas das nanoformulações. Sendo avaliadas, tamanho, formato, aglomeração e uniformidade das NB (Figura 24) e NF-10 (Figura 25). Como ilustrado nas figuras ambas as nanoformulações apresentaram tamanho menor que 200nm, formato redondo bem definido e sem aspectos de agregação.

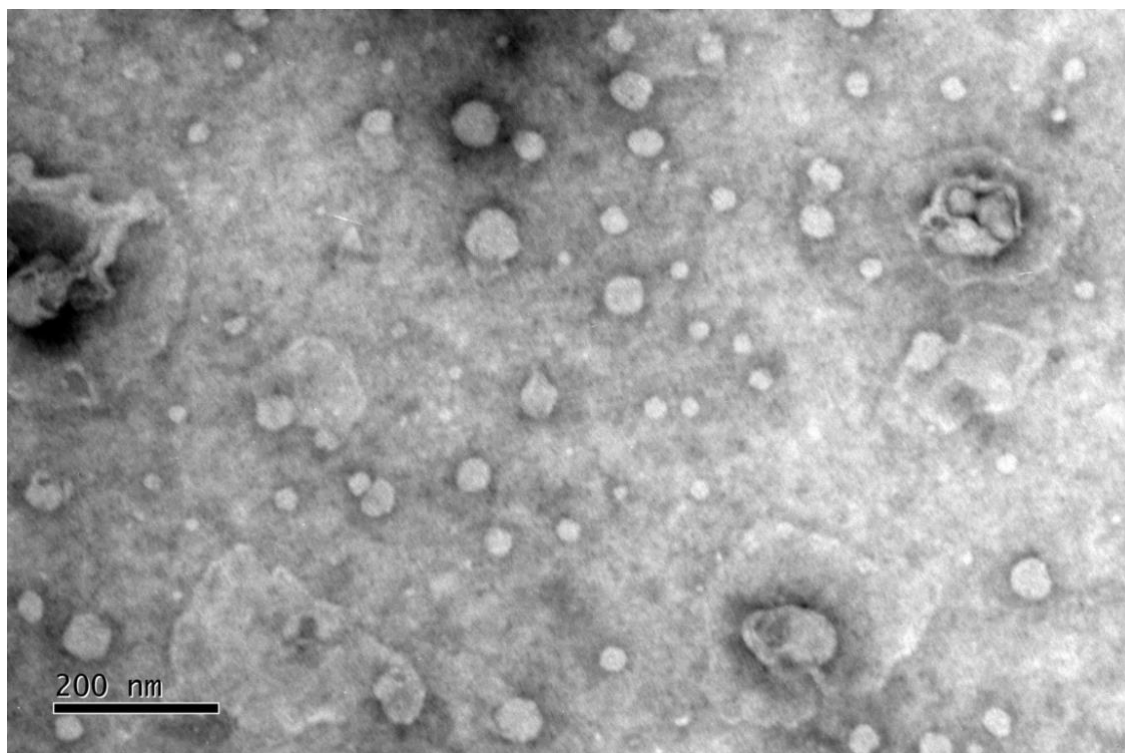


Figura 23. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da nanopartícula branca (NB) em aumento de 20.000 vezes.

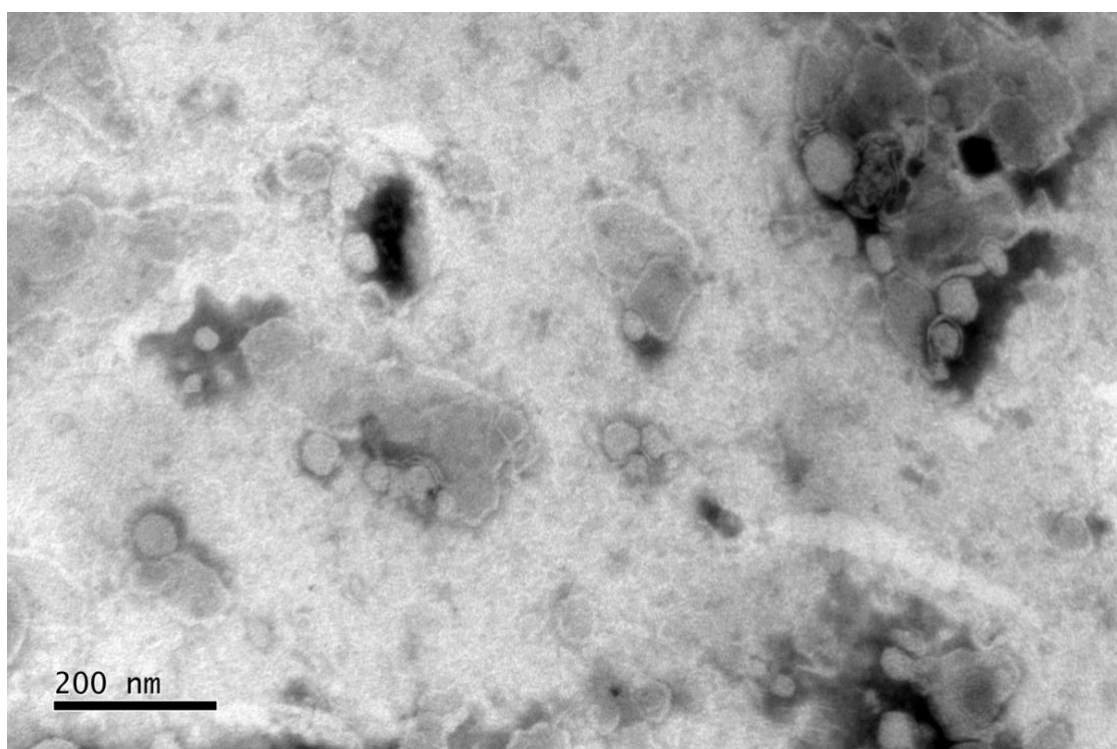


Figura 24. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da nanopartícula encapsulando o peptídeo Fraternalina-10 (NF-10) em aumento de 20.000 vezes.

4.2. Ensaios Biológicos: Avaliação da Toxicidade do peptídeo livre e da nanoformulação

4.2.1. Teste de desequilíbrio motor - Rotarod

Em relação ao protocolo de toxicidade foi analisada a coordenação motora dos animais utilizando a latência de queda do cilindro rotatório no Rotarod. O teste foi realizado nos dias, 0 (pré-teste), anterior ao primeiro dia de tratamento, dia 1 e dia 14 (Figura 26). A análise utilizada foi a ANOVA de duas vias, foi observada diferença significativa entre os dias [$F(1,928, 108) = 21,47$; $p < 0.0001$]. No entanto, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos [$F(7, 56) = 0,9373$; $p > 0.05$]. Além disso, também não foi observada diferença estatística na interação entre os dias e os tratamentos [$F(14, 112) = 0,7980$; $p > 0.05$]. Em seguida, uma análise múltipla foi feita por meio do teste de Tukey, nele foi observado uma diferença estatística em relação a NF-10 na dose de 20 $\mu\text{g}/\text{animal}$ entre o d14 e os dias PT [$p < 0.0001$] e D1 [$p < 0.05$].

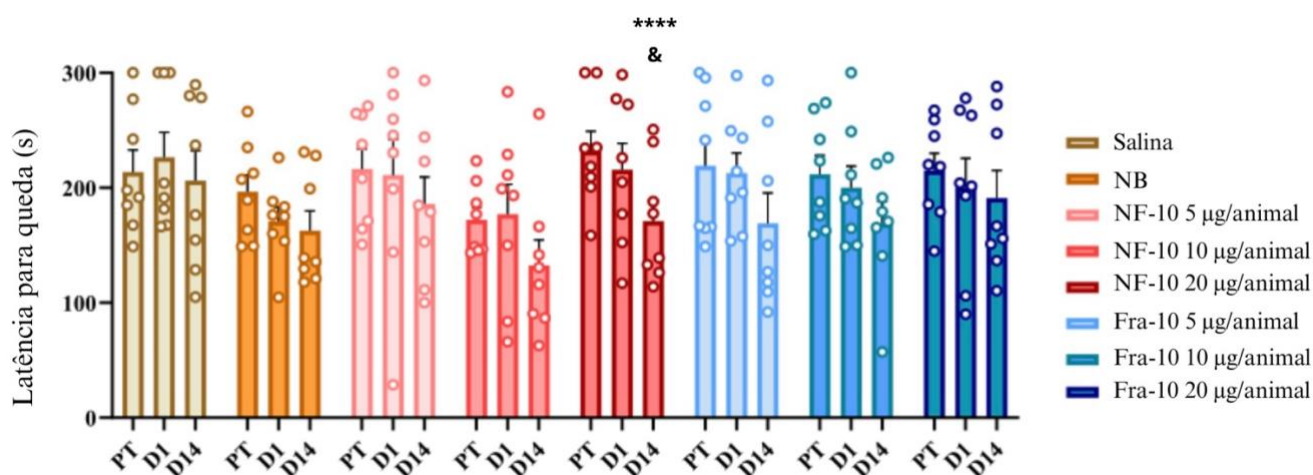


Figura 25. Latência para a queda no teste de cilindro rotatório em segundos. Dias de teste se encontram no eixo x pré-teste (PT), dia 1 (D1) e dia 14 (D14), composta pelos grupos salina, Nanopartícula branco (NB), Nanopartícula + Fraternina-10 (NF-10) (5, 10 e 20 $\mu\text{g}/\text{animal}$), Fraternina-10 (Fra-10) (5, 10 e 20 $\mu\text{g}/\text{animal}$). A análise estatística realizada foi ANOVA de duas vias e comparação múltipla utilizando o teste Tukey. (****) equivale a $p < 0.0001$ em relação ao PT. (&) equivale a $p < 0.05$ em relação ao D1.

4.2.2. Avaliação da massa corporal dos animais

Para detectar mudanças corporais, foram analisadas as variações das massas corporais dos animais ao decorrer dos 14 dias (Figura 27). Sendo comparado o primeiro dia e décimo quarto dia da massa dos animais. A análise estatística feita foi a ANOVA de uma via, a qual não mostrou diferença significativa [$F(7, 55) = 1,575$; $p > 0.05$].

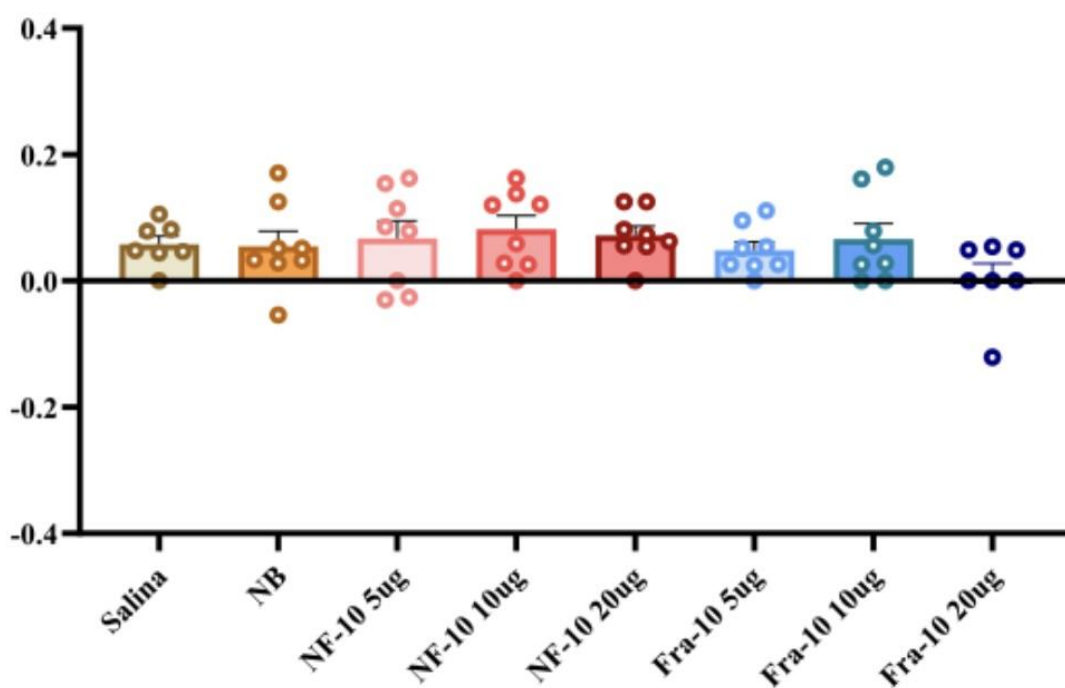


Figura 26. Variação de massa ao longo do período de 14 dias. Os grupos presentes foram, Nanopartícula branco (NB), Nanopartícula + Fraternina-10 (NF-10) (5, 10 e 20 ug/animal), Fraternina-10 (Fra-10) (5, 10 e 20 ug/animal). A análise estatística realizada foi ANOVA de duas vias e uma análise pós de comparação múltipla por meio do teste de Tukey.

4.2.3. Avaliação Histológica dos órgãos

Ao fim dos ensaios comportamentais, foi realizada a retirada do pulmão, fígado e rim, para análise histopatológica. Sendo eles cortados no criostato e passando pelo processo histológico sendo marcados por hematoxilina e eosina (H.E.). Nesse sentido foi feita a análise dos tecidos com microscopia óptica. Os seguintes grupos foram analisado: salina, NB, NF-10 (5, 10 e 20 $\mu\text{g}/\text{animal}$), Fra-10 (5, 10 e 20 $\mu\text{g}/\text{animal}$). Sendo assim, nenhuma alteração foi observada no rim (Figura 28), pulmão (Figura 29) e fígado (Figura 30) dos animais.

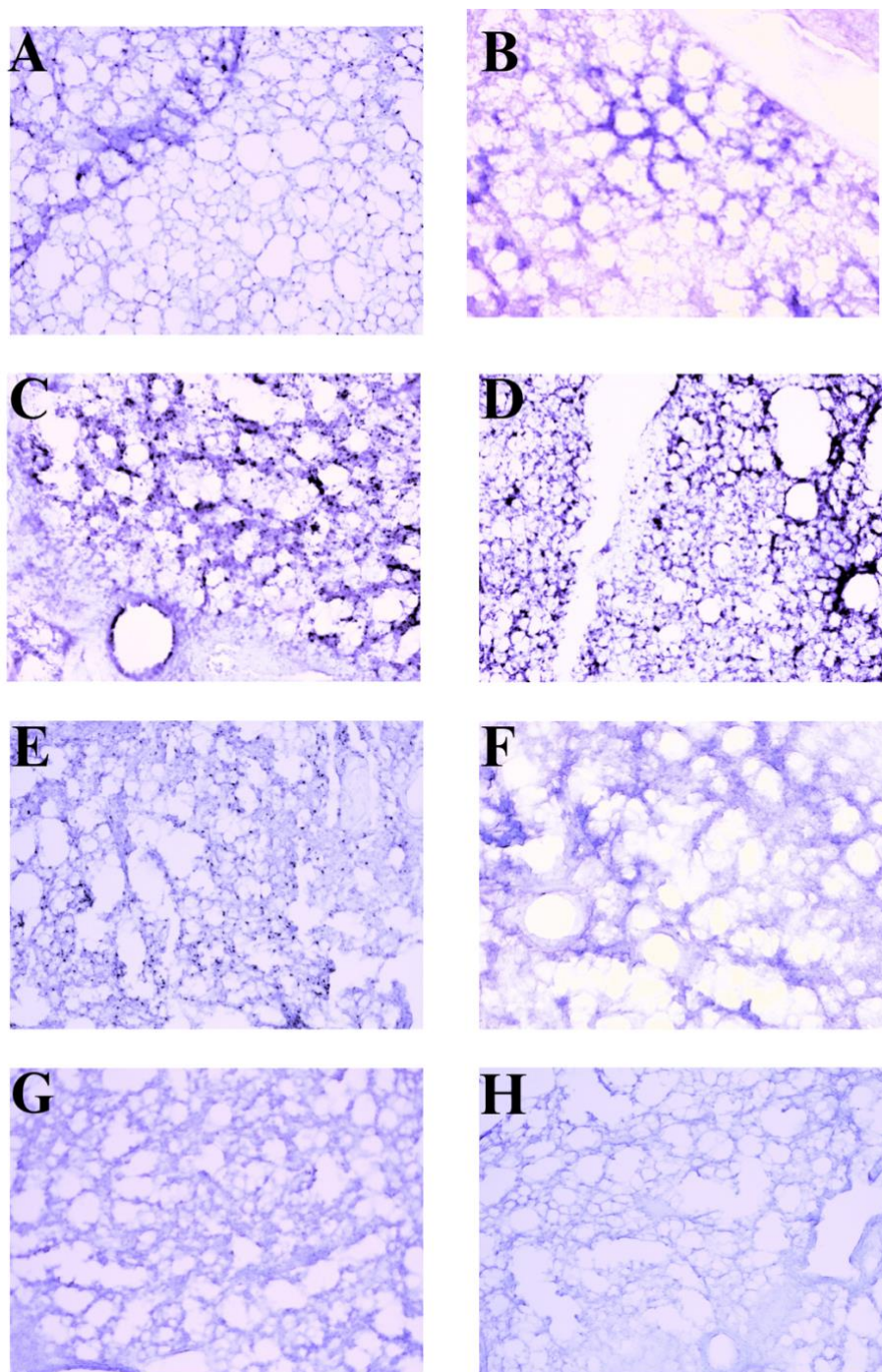


Figura 27. Análise histopatológica dos rins com corte 50 (μm), imagens com aumento 10x. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos. (A) grupo salina; (B) grupo NB; (C) grupo NF-10 5 $\mu\text{g}/\text{animal}$; (D) NF-10 10 $\mu\text{g}/\text{animal}$; (E) NF-10 20 $\mu\text{g}/\text{animal}$ (F) Fra-10 5 $\mu\text{g}/\text{animal}$; (G) Fra-10 10 $\mu\text{g}/\text{animal}$; (H) Fra-10 20 $\mu\text{g}/\text{animal}$

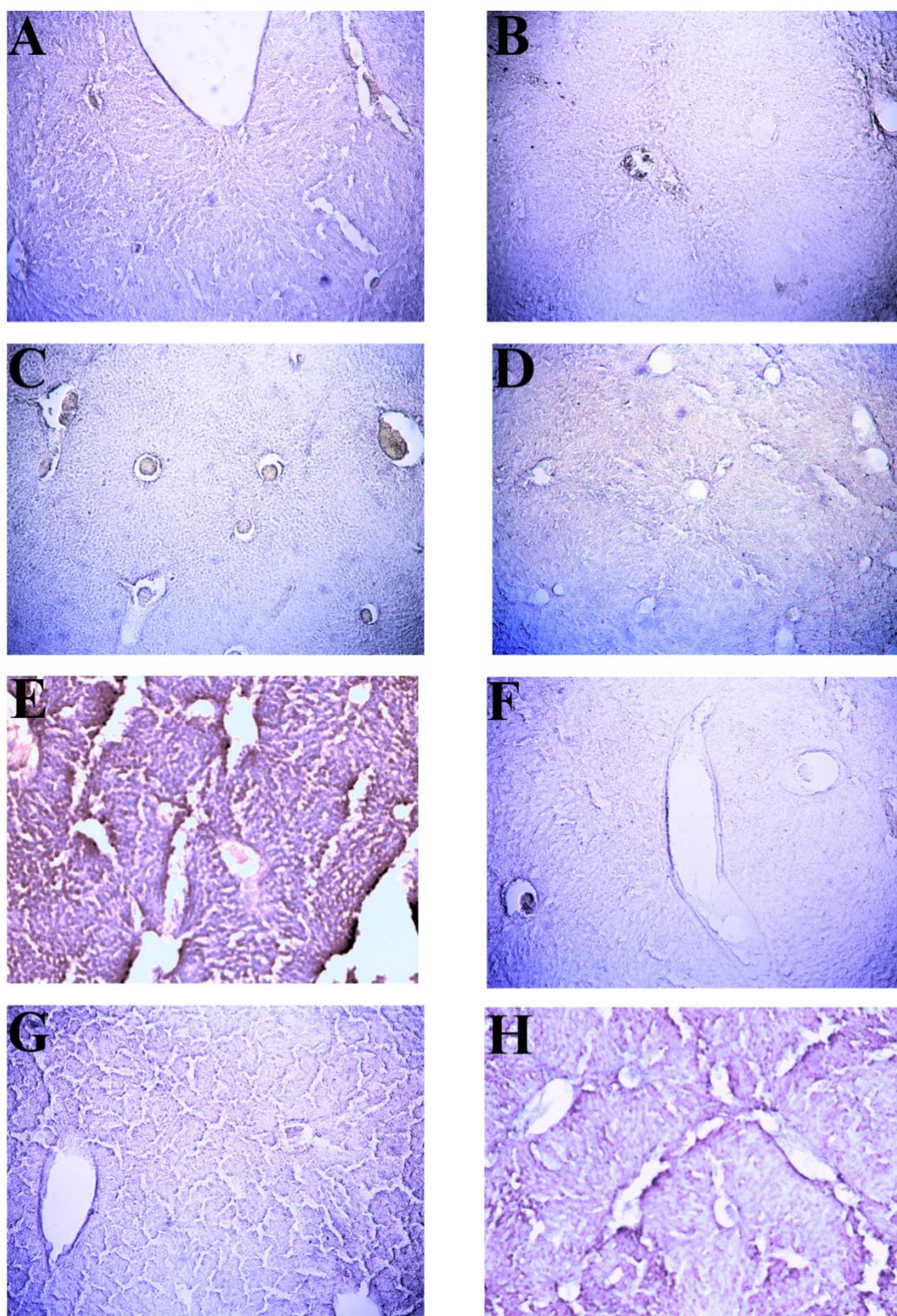


Figura 28. Análise histopatológica dos pulmões com corte 50 (μm), imagens com aumento 10x. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos. (A) grupo salina; (B) grupo NB; (C) grupo NF-10 5 $\mu\text{g}/\text{animal}$; (D) NF-10 10 $\mu\text{g}/\text{animal}$; (E) NF-10 20 $\mu\text{g}/\text{animal}$ (F) Fra-10 5 $\mu\text{g}/\text{animal}$; (G) Fra-10 10 $\mu\text{g}/\text{animal}$; (H) Fra-10 20 $\mu\text{g}/\text{animal}$

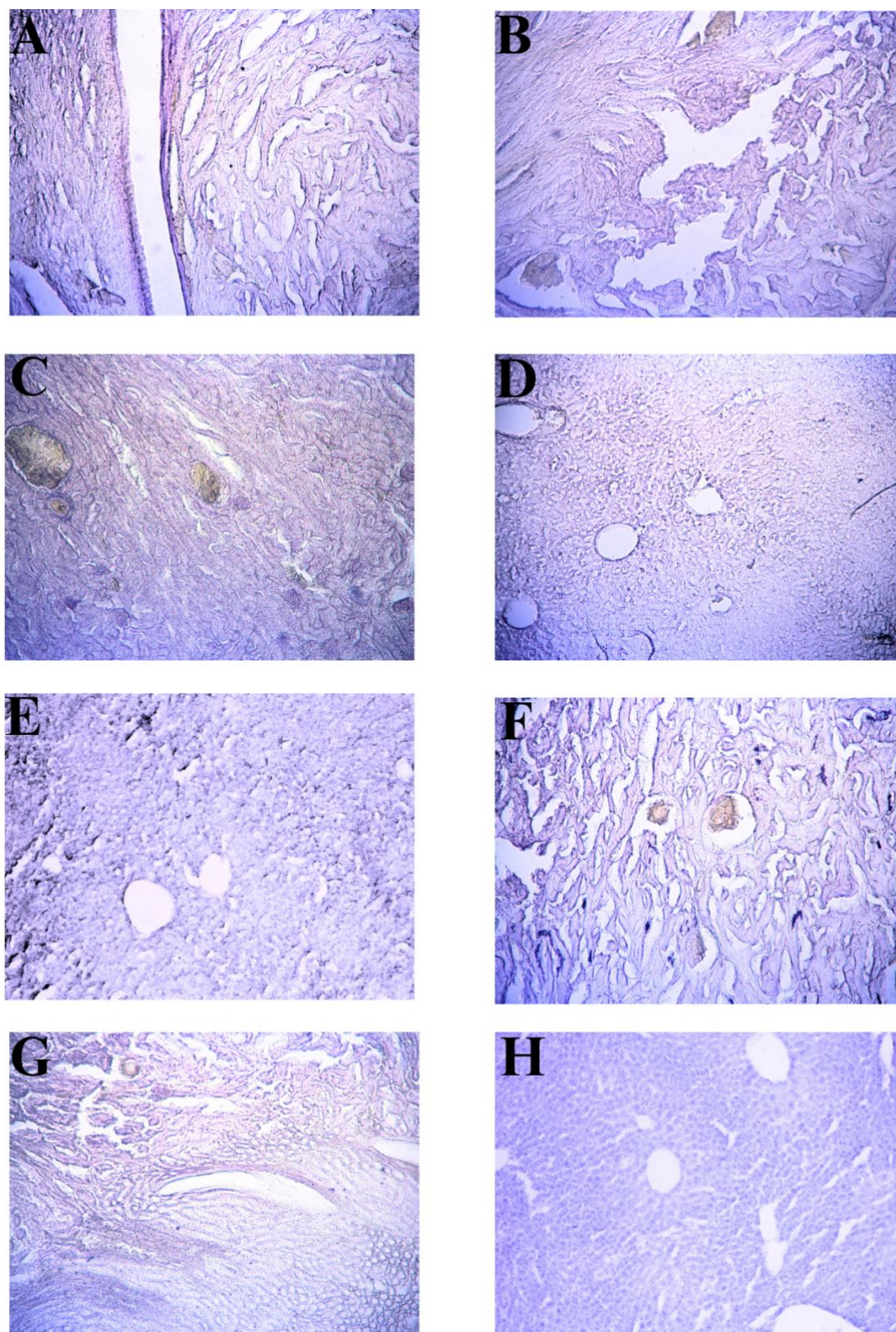


Figura 29. Análise histopatológica dos fígados com corte 50 (μm), imagens com aumento 10x. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos. (A) grupo salina; (B) grupo NB; (C) grupo NF-10 5 $\mu\text{g}/\text{animal}$; (D) NF-10 10 $\mu\text{g}/\text{animal}$; (E) NF-10 20 $\mu\text{g}/\text{animal}$ (F) Fra-10 5 $\mu\text{g}/\text{animal}$; (G) Fra-10 10 $\mu\text{g}/\text{animal}$; (H) Fra-10 20 $\mu\text{g}/\text{animal}$.

4.3. Avaliação dos sinais não-motores no modelo de 6-OHDA

4.3.1. Comportamentos do tipo de ansiosos avaliados no LCE

4.3.1.1. Determinação da dose de 6-OHDA

Visando ter uma dose padronizada capaz de reproduzir sinais não-motores, duas doses de 6-OHDA foram testadas (40 e 30 ug/animal). O comportamento utilizado para a escolha foi o do tipo ansioso utilizando o teste de labirinto em cruz elevado (LCE) (Figura 28). Nessa análise foi usada ANOVA de duas vias, foi observada diferença significativa entre a porcentagem de tempo de exploração em cada um dos braços [$F(1, 42) = 31,53$; $p > 0,0001$], mas não entre os tratamentos [$F(2, 42) = 4,003$ e -022 ; $p > 0.9999$]. Em relação a interação diferença estatística significativa pode ser observada [$F(2, 42) = 22,75$; $p < 0.0001$]. Em seguida foi feita uma comparação múltipla utilizando o teste de Tukey, onde a dose de 30 ug/animal demonstrou diferença significativa para os grupos veículo [$p < 0.001$] e 40 ug/animal [$p < 0.0001$].

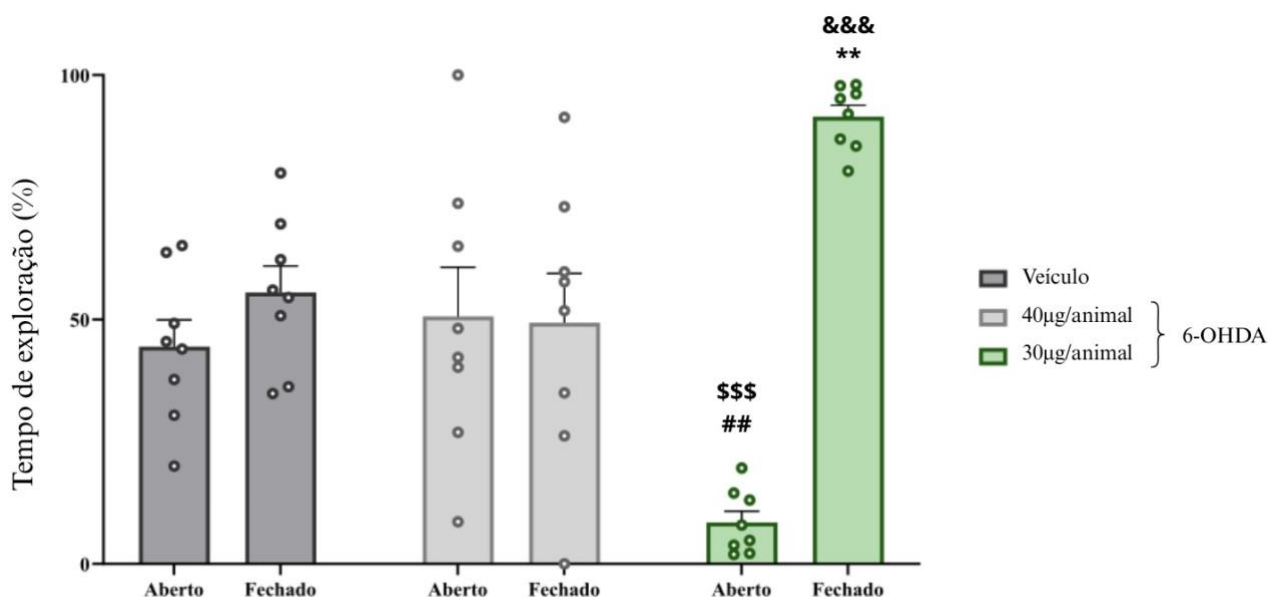


Figura 30. Análise de comportamentos do tipo ansioso no aparato de labirinto em cruz elevado. Os grupos presentes foram veículo, dois grupos com doses distintas de 6-OHDA 40 ug/animal e 30 ug/animal. A análise estatística realizada foi a ANOVA de duas vias, seguido por o teste de Tukey de comparação múltipla. (**) equivale a $p < 0.01$ em relação ao braço fechado do grupo veículo. (&&&) equivale a $p < 0.0005$ em relação ao braço fechado do grupo 40 ug/animal. (##) representa $p < 0.01$ em relação ao grupo veículo no braço aberto. (\$\$\$) representa $p < 0.0005$ em relação ao grupo 40 ug/animal de 6-OHDA no braço aberto.

4.3.1.2. Avaliação terapêutica

Após a escolha da dose de 6-OHDA foi feita a análise do potencial terapêutico da Fraternina-10 envelopada pela nanopartícula (NF-10) na dose de (10 ug/animal) utilizando o LCE (Figura 29). O tratamento com a NF-10 reduziu os comportamentos do tipo ansiosos em relação ao grupo 6-OHDA. A análise foi excetuada com os grupos veículo, a dose de 6-OHDA escolhida, um grupo tratamento de NF-10 em sua dose terapêutica. Os mesmos padrões de analisada utilizados para a escolha da dose de 6-OHDA foram usados para essa análise. Foi apresentado diferença estatística significativa em relação aos braços [$F(1, 42) = 218,2$; $p < 0.0001$], mas entre os grupos não foi observada diferença [$F(2, 42) = 1,396e-021$; $p > 0.9999$]. No que se refere, a interação observou-se diferença estatística [$F(2, 42) = 39,06$; $p < 0.0001$]. Em seguida, foi feita uma análise de comparação múltipla com um teste de Tukey ambos os

grupos 6-OHDA e NF-10 apresentaram diferença estatística em relação ao veículo [$p<0.0001$] e [$p<0.001$] respectivamente. Além disso foi apresentada diferença entre o grupo 6-OHDA e NF-10 [$p<0.05$].

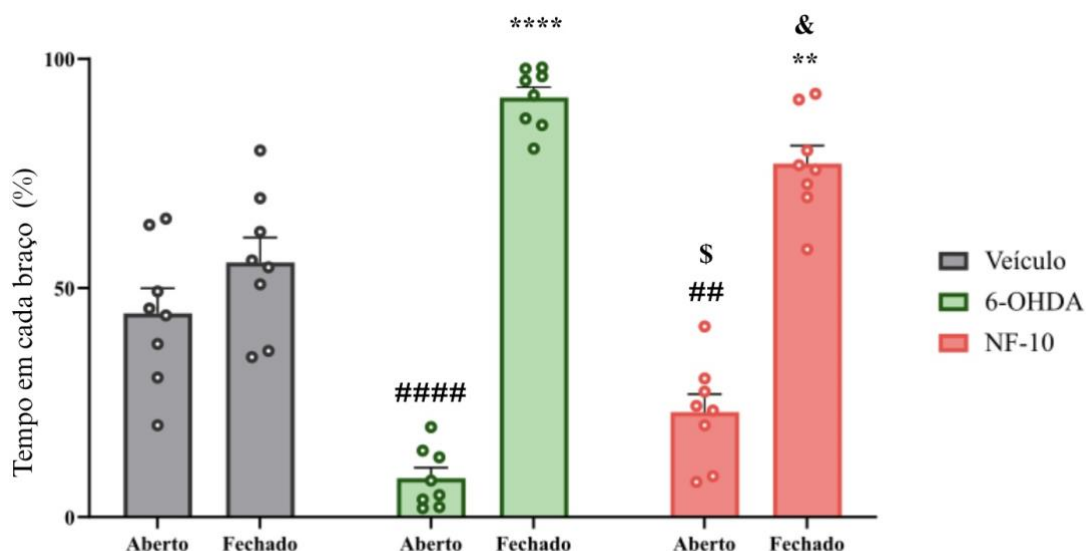


Figura 31. Teste de labirinto em cruz elevado utilizado como indicador de ansiedade. Foram comparados a porcentagem de tempo passada em cada tipo de braço (aberto e fechado). Três grupos de tratamentos veículo, 6-OHDA e Fraternina-10 envelopada pela nanopartícula (10 ug/animal) (NF-10). Análise estatística realizada foi a ANOVA de duas vidas, seguida pelo teste de Tukey de comparação múltipla. (****) representa $p<0.0001$, (**) representa $p<0.01$, em relação ao grupo veículo nos braços fechados. (####) representa $p<0.0001$, (##) representa $p<0.001$, em relação ao grupo veículo nos braços abertos. (&) representa $p<0.05$ em relação ao grupo 6-OHDA nos braços fechados. (\$) representa $p<0.05$ em relação ao grupo 6-OHDA nos braços abertos.

4.3.2. Avaliação dos comportamentos espontâneos no teste do campo aberto - Open Field

Visando avaliar alguns aspectos de movimentação espontânea dos animais alguns parâmetros foram analisados, utilizando o teste do campo aberto. No teste do campo aberto um dos aspectos analisado foi a distância percorrida total no aparato (Figura 30 A). O peptídeo reduziu a distância percorrida (m) em relação ao grupo veículo (sadio).

A análise estatística utilizada foi a Anova de uma via, que, apresentou diferença estatística [$F(2, 21) = 4,895$; $p<0.05$], uma comparação múltipla foi feita em seguida com teste

de Tukey, e foi observada diferença estatística significativa entre os grupos veículo e NF-10 [$p < 0.05$], em relação aos grupos veículo e 6-OHDA não houve diferença entre eles [$p > 0.05$].

O tempo imóvel dos animais no aparato também foi analisado (Figura 30 B), e o grupo tratado com a NF-10 apresentou um aumento do tempo imóvel dos animais. A mesma análise estatística foi feita, houve diferença estatística significativa [$F(2, 21) = 7,602$ $p < 0.01$]. O teste de Tukey mostrou diferença estatística entre o grupo NF-10 e o veículo, novamente não foi encontrada diferença entre os grupos veículo e 6-OHDA [$p > 0.05$].

Por último, velocidade média foi medida (Figura 30 C), ela foi analisada por meio da mesma análise que os outros parâmetros, novamente houve diferença estatística [$F(2, 21) = 4,579$; $p < 0.05$]. Dessa forma, o grupo tratado com o peptídeo teve uma redução da velocidade. O teste Tukey apresentou diferença estatística entre os grupos veículo e NF-10 [$p < 0.05$], não houve diferença entre os grupos veículo e 6-OHDA [$p > 0.05$].

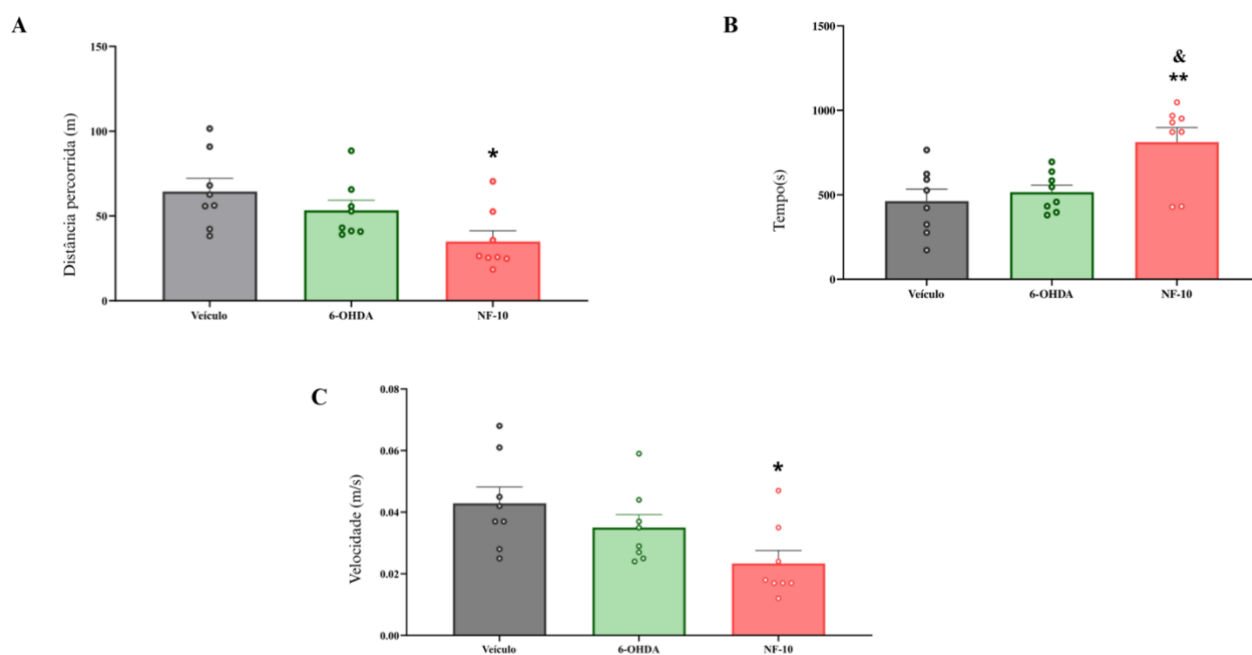


Figura 32. Parâmetros do teste do campo aberto, analisando aspectos motores. Os grupos presentes no teste foram veículo, 6-OHDA e Fraternina-10 envelopada pela nanopartícula (NF-10). A análise estatística realizada foi a ANOVA de duas vias, seguida por uma comparação múltipla com o teste de Tukey. (A) distância percorrida total pelo animal em metros. (B) tempo total passado imóvel em segundos pelos animais. (C) Velocidade média dos animais em metros por segundo. Teste estatístico realizado foi (**)

equivale a $p < 0.01$, (*) equivale a $p < 0.05$ em relação ao grupo veículo. (&) equivale a $p < 0.05$ em relação ao grupo 6-OHDA.

4.3.3. Avaliação da memória utilizando o Teste de Reconhecimento de Objeto Novo (TRON)

4.3.3.1. Padronização do TRON

Para a realização da avaliação de memória de novidade de longo praso, foi necessária a padronização do Teste de Reconhecimento de Objeto Novo (TRON) (Figura 31). Nesse teste, foram utilizados animais sadios, visando analisar se os animais se interessam igualmente pelos objetos. Sendo assim, foi observada a preferência dos animais pelo objeto novo. Um teste T não pareado foi feito, observou-se diferença significativa entre os objetos novo e familiar [$p < 0.0005$], com uma preferência pela exploração do objeto novo.

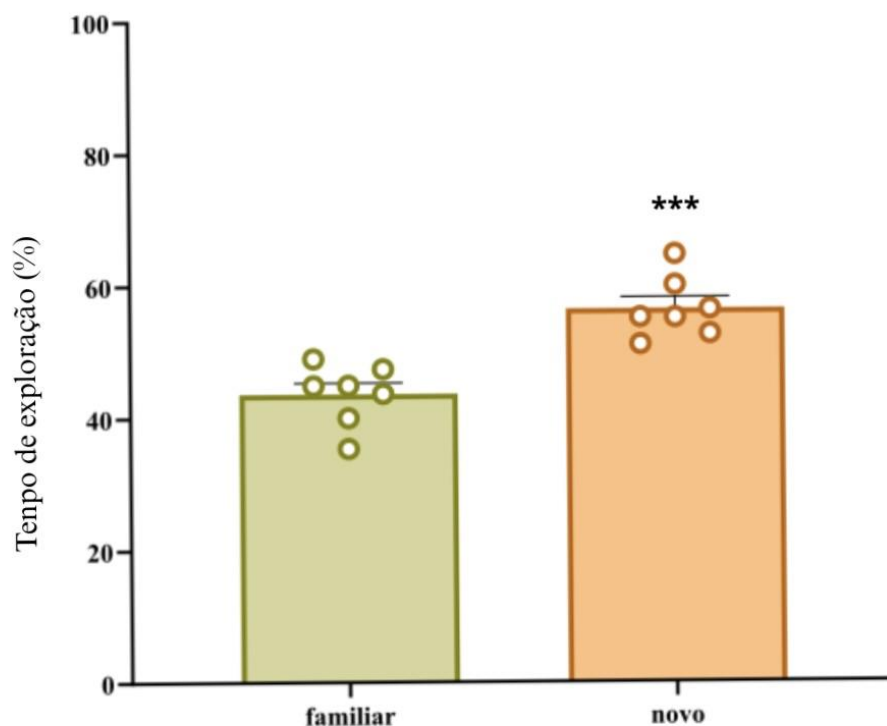


Figura 33. Teste de Reconhecimento de Objeto Novo foi feito visando avaliar memória de longo prazo. O único grupo de animais saudáveis foi usado. A comparação foi feita entre a porcentagem de tempo explorando cada objeto, o familiar e o novo. A análise estatística utilizada foi um teste T não pareado. (***) equivale a $p < 0.0005$ em relação ao objeto familiar.

4.3.3.2. Avaliação Terapêutica

Após a padronização do teste foi feita a avaliação entre os grupos veículo, 6-OHDA, e NF-10 em sua dose terapêutica (Figura 32). Foi feita uma Anova de duas vias, que apresentou diferença estatística entre a preferência em explorar os objetos [$F(1, 38) = 8,310$; $p < 0.01$], não teve diferença estatística entre os tratamentos [$F(2, 38) = p > 0.05$]. Além disso, foi observada diferença na interação entre os objetos e os tratamentos, [$F(2, 38) = 13,94$; $p < 0.0001$]. Posteriormente, foi feita uma comparação múltipla com um teste de Tukey, que apresentou diferença em relação ao grupo veículo e os grupos 6-OHDA e NF-10 [$p < 0.05$].

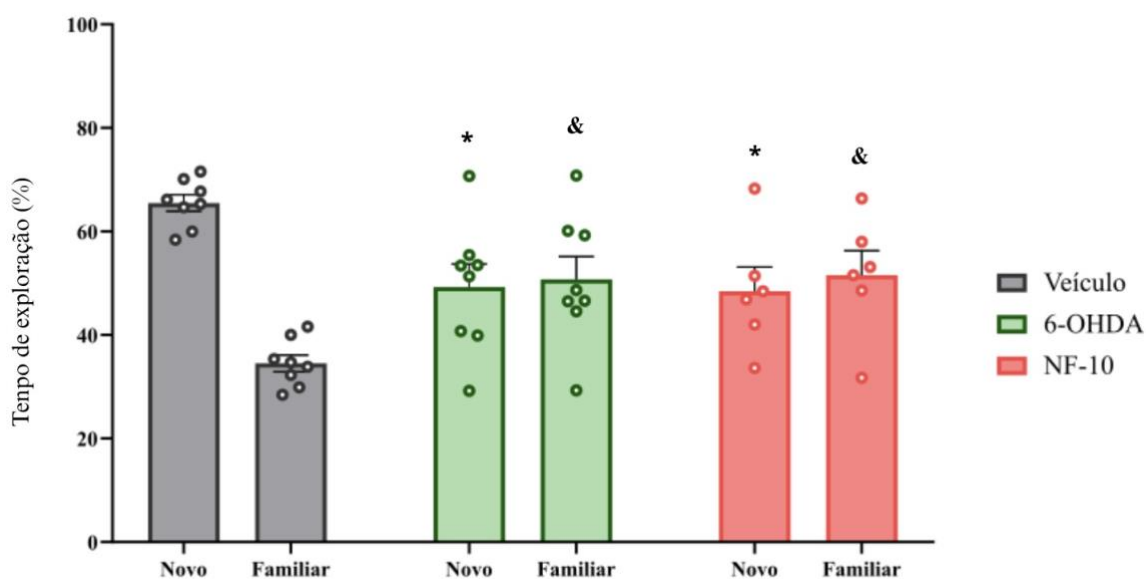


Figura 34. Avaliação do efeito terapêutico do peptídeo envelopado por uma nanopartícula por meio do Teste de Reconhecimento de Objeto Novo. Os grupos presentes foram veículo, 6-OHDA, e Fraternina-10 envelopada pela nanopartícula (NF-10). A análise estatística realizada foi a ANOVA de duas vias, seguida por uma comparação múltipla com o teste de Tukey. (*) equivale a $p < 0.05$ em relação a porcentagem de exploração do objeto novo do grupo veículo. (&) equivale a $p < 0.05$ em relação a porcentagem de exploração do objeto familiar do grupo veículo.

4.3.4. Avaliação por imuno-histoquímica

O último processo feito após a finalização do protocolo foi a análise imunohistoquímica do encéfalo dos animais na região da SN. Dessa forma, visando avaliar a neurodegeneração do grupo 6-OHDA. Sendo assim, a marcação e em seguida contagem dos neurônios TH⁺. Em relação a contagem o lado ipsilateral demonstrou uma redução de neurônios TH⁺ em relação ao lado contralateral (Figura 33). A análise estatística foi feita utilizando um teste t não pareado, que apresentou diferença estatística entre o lado contralateral e ipsilateral [$p < 0.0005$].

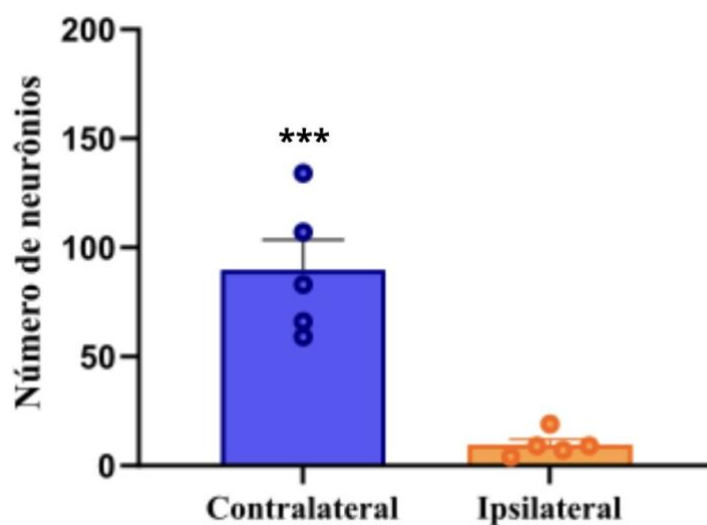


Figura 35. Avaliação da neurodegeneração por meio da contagem de neurônios TH⁺. A análise foi entre o lado contralateral (sadio) e lado ipsilateral (lesionado), a análise estatística foi um teste t não pareado. (***) equivale a $p < 0.0005$ em relação ao lado ipsilateral.

As imagens foram feitas com microscopia, por meio de imunofluorescência para TH⁺ (verde) e DAPI (azul). Sendo assim, demonstrou-se uma neurodegeneração na SN do lado ipsilateral, que foi infundado com 6-OHDA, quando comparado com o lado contralateral (Figura 34).

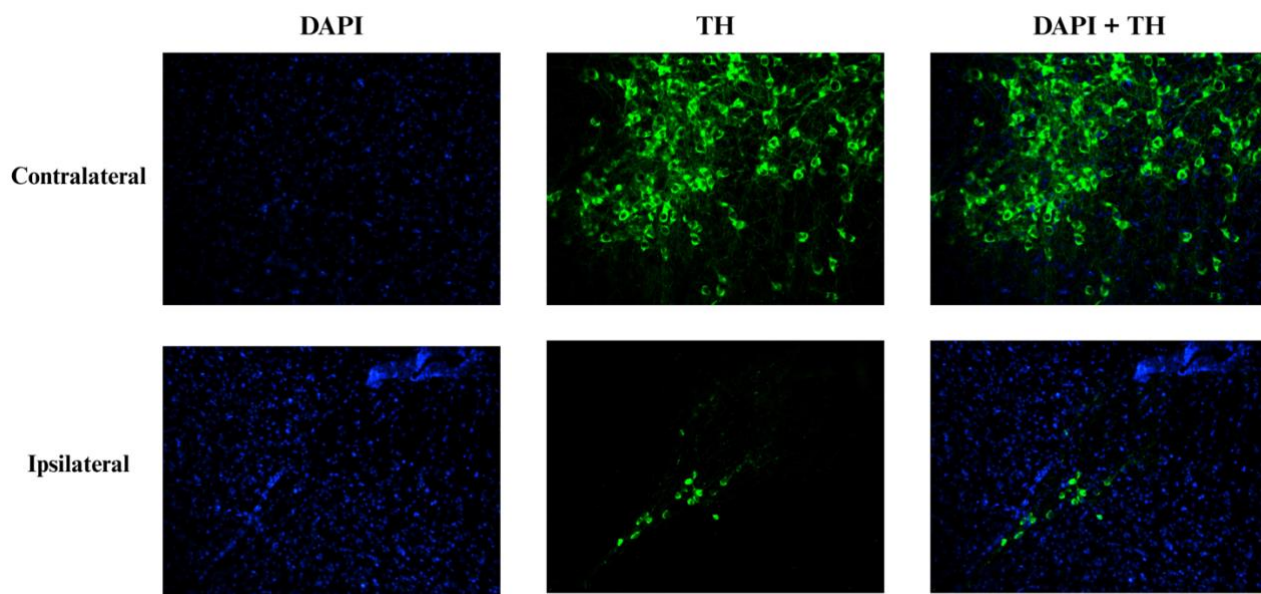


Figura 36. Imagem da contagem de neurônios de TH⁺ do grupo 6-OHDA nos lados contralateral (sem lesão) e ipsilateral (lesionado) em aumento de 20 vezes. A marcação de TH representa neurônios dopaminérgicos, já a do DAPI marca o núcleo dos neurônios.

5. DISCUSSÃO

Quando buscando por novos tratamentos para a DP, otimizar a biodisponibilidade é sempre uma prioridade. Tendo em vista, que além dos desafios do composto ser metabolizado que todo fármaco enfrenta, doenças neurológicas tem outra camada que é o desafio de ultrapassar a BHE. Dessa forma, a junção de uma nanopartícula com a via intranasal é uma estratégia interessante, pois é uma via que permite evitar a BHE e a nanotecnologia melhora a absorção para o bulbo olfatório aumentando a quantidade de peptídeo no SNC, além disso ela é capaz de proteger o peptídeo contra degradação periférica e rápida (SAMARIDOU; ALONSO, 2018). Sendo assim, essa combinação se mostrou uma excelente opção para o primeiro uso da Fraternina-10 sem ser por via intracerebroventricular. O tipo de nanoformulação escolhida foi uma nanopartícula lipídica (NPL) que já demonstrou que pode ser utilizada de forma intranasal (NAIR *et al.*, 2023). Dentro das NPLs, nesse trabalho foi formulada uma nanocápsula que já foi utilizada no laboratório em associação com outro peptídeo (Mota, 2024).

A nanocápsula demonstrou estabilidade das suas características físico-químicas durante todo o período de 120 dias. Em relação ao diâmetro hidrodinâmico, a formulação NF-10 não demonstrou diferença estaticamente no seu tamanho em relação a nenhum dos seus dias. Tendo um tamanho médio de 179 nm que é condizente com a literatura em relação nanopartículas lipídicas utilizadas por via intranasal (SAMARIDOU; ALONSO, 2018). A única diferença observada foi em relação a NB sendo elas de tamanhos diferentes em seus respectivos dias de medição. Dessa forma podemos concluir que mostrou uma estabilidade em relação ao tamanho já que não teve um crescimento significativo do dia 1 ao 120, além disso a única diferença de tamanho foi entre as nanoformulações, o que é esperado tendo em vista que a NF-10 possui o peptídeo envelopado e a NB está vazia. Além disso, a diferença entre elas era proporcional mantendo uma diferença similar em cada dia, ou seja, ambas aumentaram de tamanho com o passar do tempo em um ritmo parecido, com a exceção do primeiro dia.

Nesse sentido, atrelado ao tamanho está o índice de polidispersão (PDI) medindo o grau de heterogeneidade da formulação. Nesse sentido, índices menores que 0,5 são considerados nanoformulações monodispersas, já quando são acima de 0,7 são consideradas polidispersas com alto grau de heterogeneidade (MUDALIGE *et al.*, 2018). Levando isso em consideração a NF-10 apresentou um PDI médio de 0,54, portanto apesar de não ser completamente monodispersa ela apresenta uma polidispersão muito baixa, sendo condizente com a literatura

para nanopartículas que não utilizam homogeneização de alta pressão (MONGE-FUENTES *et al.*, 2021). Tendo em vista, que a NF-10 não é totalmente monodispersa, é importante ressaltar que na análise, o espalhamento dinâmico de luz tende a medir a maior partícula encontrada (GALLEGO-URREA; TUORINIEMI; HASSELLÖV, 2011). Isso pode ser comprovado quando analisamos as imagens feitas pela microscopia eletrônica de transmissão, que mostra moléculas consideravelmente menores que 200 nanômetros.

As nanopartículas com Potencial Zeta (PZ) perto de zero tendem a aglomeração, devido as partículas não se repelirem. No entanto, a separação das partículas pode ser feita por impedimento estérico (HEURTAULT *et al.*, 2003). Nesse sentido, a lecitina é um dos compostos capazes de ter esse efeito estabilizador e evitar separação (LETONA *et al.*, 2019; YUSSOF *et al.*, 2023; ZHOU *et al.*, 2023), então mesmo com baixa carga não foi observada aglomeração das partículas da nanocápsula. Isso pode ser atestado pela análise no MET e pela taxa de crescimento da nanocápsula ao decorrer do tempo. Além disso, outra comprovação da ausência de mudanças drásticas nas características citadas é que o pH em nenhum momento foi alterado. Sendo assim, todos os aspectos físico-químicos demonstraram consistência mantendo seus números razoavelmente similares. Exceto do período do dia 1 ao dia 7, muito provavelmente um intervalo em que a nanoformulação ainda estava se estabilizando.

Quanto aos testes *in vivo* da nanocápsula e do peptídeo livre na maioria dos grupos, nenhuma alteração foi vista no protocolo de toxicidade de dose única. Sendo assim, a dose de 20 µg/animal da NF-10 apresentou piora de coordenação motora nos testes do Rotarod do dia 14 em comparação aos dias 1 e pré-treino. Nesse sentido, a causa desse déficit é incerta, no entanto, pode ter sido fruto de um aumento de biodisponibilidade causado pela nanocápsula. Tendo em vista que, o peptídeo livre na mesma dose não apresentou um declínio similar. Além disso, a causa da toxicidade ser atrelada a nanocápsula pode ser descartada, já que, a NB não demonstrou nenhum tipo de toxicidade no ensaio.

Adicionalmente, os animais não apresentaram perda de massa corporal anormal. Estes resultados foram condizentes com os dois outros peptídeos do laboratório, Neurovespina (Rezende, 2025) e Ocidentalina-1202 (Pinheiro, 2023), que passaram pelo mesmo protocolo.

Em relação a padronização do modelo de sinais não-motores foram testadas duas doses de 6-OHDA, a dose padrão do laboratório para a reprodução de sinais motores de 40 µg/animal

(Avohay 2016) e uma dose menor de 30 $\mu\text{g}/\text{animal}$, tendo em vista que para a reprodução dos sinais não-motores normalmente é necessária a redução da dose que grupos de pesquisa usam nos seus protocolos com sinais motores (MASINI *et al.*, 2021). Nesse caso não foi diferente, a menor dose foi capaz de gerar um aumento do tempo passado no braço aberto em comparação ao grupo veículo no LCE, 8,5% e 44,5% respectivamente. Dessa forma, o protocolo de infusão unilateral utilizado foi capaz de reproduzir comportamentos de ansiedade, similar a alguns casos observados na literatura (KIM *et al.*, 2022).

Além disso, o grupo que recebeu 40 $\mu\text{g}/\text{animal}$ apresentou um comportamento contrastante ao da outra dose de 6-OHDA. Ele demonstrou uma leve preferência ao braço aberto, passando mais tempo que o grupo veículo, 50,6%. Apesar de não ter sido uma diferença estaticamente significativa, esse resultado pode sugerir uma possível diminuição do medo em relação a avaliação de perigo (DOREMUS; VARLINSKAYA; SPEAR, 2006). Em contrapartida, isso pode ser atribuído a uma locomoção comprometida, logo para chegar a uma conclusão requer uma análise do tempo imóvel e distância percorrida. Nesse sentido esses dados foram coletados e a análise pode ser feita posteriormente.

É importante ressaltar que devido ao processo de padronização do TRON em termos de local e objetos, a análise de ansiedade com o teste LCE ocorreu anteriormente. Por conta disso, a análise de movimentos espontâneos no OF e a análise de memória de novidade de longo prazo com o TRON foram feitas somente com o grupo de 6-OHDA 30 $\mu\text{g}/\text{animal}$.

O teste de reconhecimento de objeto novo (TRON) precisou passar por um processo de padronização. Apesar do teste já ter sido utilizado no nosso grupo de pesquisa, quando os primeiros dados desse trabalho foram analisados foi observado uma baixa interação com os objetos. Nesse sentido, foi necessária a troca desses objetos, sendo feitos com objetos maiores. Os objetos originais possuíam 5 cm, já os novos possuem 8 cm de altura. Além disso, foi necessária a mudança dos locais, por conta da preferência por um dos lados devido a conformação dos holofotes da sala de ensaios. Sendo assim, os objetos ficaram localizados no centro da arena com 10 cm de distância das paredes laterais. Os animais sadios ($n=8$) apresentaram tempo de exploração maior (56,4%) pelo objeto novo, algo esperado em animais sem déficits cognitivos (DENNINGER; SMITH; KIRBY, 2020). A exploração foi definida pela interação do focinho do animal com o objeto. Sendo assim, ele estando direcionado ao objeto e

com no máximo 3 cm de distância dele. No que se refere a literatura, a distância que é considerada padrão, varia entre 1 e 4 cm (ANTUNES; BIALA, 2011).

Posteriormente com a padronização do TRON, foi avaliada se a dose de 30 µg/animal gerava déficit motor. Isso foi mostrado com o grupo 6-OHDA apresentando nenhuma diferença em tempo explorado do objeto novo (49,3%) e o familiar (50,7%). Dessa forma, os animais não tiveram preferência pelo objeto, indicando que os animais não apresentaram fixação de memória ao longo prazo ou identificação do objeto com familiar. Diferente dos animais do grupo veículo que apresentaram clara preferência pelo objeto novo, tendo uma média de 65,5 % de tempo de exploração. Essa diferença destoante de exploração do objeto novo entre os grupos veículo e 6-OHDA demonstra um déficit cognitivo em relação a detecção de novidade dos animais doentes.

Esse tipo de comportamento já foi replicado várias vezes em modelos de 6-OHDA. Nesse sentido lesões bilaterais no estriado (MASINI *et al.*, 2018) e lesões unilaterais no feixe prosencefálico medial (CUI *et al.*, 2024) apresentaram déficits de memória de longo prazo no TRON. Protocolos de lesão unilateral já geraram déficit de memória espacial utilizando um teste de labirinto em Y (SOMENSI *et al.*, 2021; YU *et al.*, 2020). Levando isso em consideração, esse protocolo foi capaz de gerar problemas de memória de longo prazo por meio de uma lesão unilateral no estriado.

Os animais do grupo 6-OHDA não apresentaram nenhuma alteração motora espontânea no teste do OF. Quando comparado com o grupo veículo em relação a distância percorrida, o grupo 6-OHDA teve média de 53,31 metros e o veículo de 64,43 m. Em relação a velocidade média, o mesmo comportamento foi visto com grupo veículo possuindo uma média de 0,043 m/s e o grupo 6-OHDA com 0,035 m/s. Além disso, não foi observada diferença no tempo imóvel dos grupos veículo e 6-OHDA, passando em média 462,5 segundos e 515,9 s, respectivamente. Esses resultados sugerem que este modelo foi capaz de gerar comportamentos ansiosos e déficits cognitivos sem gerar sinais motores significativos. Sendo assim, esses dados são pouco documentados na literatura em relação a lesões unilaterais no estriado por 6-OHDA. A principal vantagem da ausência de sinais motores é a exclusão de uma possível variável na influência dos sinais não-motores (PRATES-RODRIGUES *et al.*, 2025). Dessa forma, possibilitando uma análise exclusiva dos sinais não-motores, semelhante a fase prodrômica da

doença (MULEIRO ALVAREZ *et al.*, 2024). Entretanto, para melhor afirmar a ausência de sinais motores, seria interessante realizar um teste que avalia coordenação motora, como o teste de Rotarod.

Após a padronização do modelo não-motor, pela comprovação da presença de déficits cognitivos e comportamentos do tipo ansiosos, foi feita a avaliação terapêutica da fraternina-10 nanoencapsulada (NF-10). Nesse sentido, na avaliação de efeito terapêutico da NF-10, foi utilizada somente a dose de 10 µg/animal devido a uma restrição de tempo. O peptídeo nanoencapsulado demonstrou melhora do comportamento ansioso gerado pela 6-OHDA, tendo uma média de 22,9% de tempo passado no braço aberto. No entanto, a NF-10 não foi capaz de reverter o sinal de ansiedade ao ponto de ficar similar ao grupo veículo. Para uma avaliação mais completa seria interessante uma análise de todos os tratamentos que foram utilizados na análise de toxicidade, uma vez que nunca foi feita uma análise do efeito terapêutico do peptídeo em relação a sinais não-motores. Além disso, no TRON, a NF-10 não mostrou melhora do déficit cognitivo causado pela 6-OHDA. Dessa forma, a NF-10 mostrou ter efeito em comportamentos ansiosos, mas não em questões cognitivas.

Em relação a movimentação espontânea analisada pelo OF, a NF-10 apresentou piora motora em todos os aspectos analisados. Sendo assim, o grupo passou mais tempo imóvel que o restante dos grupos passando em média 812 segundos. Além disso, os animais do grupo andaram uma menor quantidade em comparação com os grupos 6-OHDA e veículo, tendo em média 35 metros de distância total percorrida. Por último, a velocidade dos animais também foi consideravelmente menor, com uma média de 0,02 (m/s) no grupo. Levando isso em consideração, o grupo apresentou quase metade da distância percorrida e velocidade média em comparação ao grupo veículo. Adicionalmente, o grupo passou o dobro do tempo imóvel em relação ao grupo veículo. Apesar do grupo NF-10 não ter apresentado toxicidade no protocolo de dose única, no protocolo da DP isso ficou aparente. O grupo NF-10 apresentou uma piora motora em relação aos animais do grupo 6-OHDA. Sendo assim, é necessária uma análise de toxicidade crônica para determinar se o efeito de déficit motor é causado somente pela NF-10 ou é um efeito sinérgico com a 6-OHDA.

Visando comprovar a lesão na SN foi feita um processo de imunohistoquímica com marcação de TH. Sendo assim, foi feita a comparação do lado contralateral, lado contrário da

infusão de 6-OHDA, e o lado ipsilateral, lado da infusão de 6-OHDA. Isso foi feita por meia da contagem de neurônios TH+, que são os neurônios dopaminérgicos. As marcações de neurônios dopaminérgicos TH+ demonstraram uma diferença grande entre os lados na região registrada pela microscopia. O lado contralateral apresentou uma média de 89,8 neurônios, já o lado ipsilateral possuiu somente 7 neurônios. Dessa forma, a degeneração na área da SN causada pela 6-OHDA pôde ser confirmada. Levando isso em consideração, pode-se confirmar a presença dos sinais não-motores e da perda dopaminérgica.

Entretanto, mais análises precisam ser feitas para melhor entender essa correlação. Tendo em vista que a região na qual as fotos foram tiradas, sendo ela uma região mais na extremidade da SNPC. Dessa forma, degeneração dessa região ocorre anteriormente a regiões mais centrais (CUI *et al.*, 2024). A análise da presença de neurônios dopaminérgicos na região total da SN seria necessária. Adicionalmente, uma avaliação de densidade de neurônios TH+ na região do estriado também precisa ser feita. Além disso, a análise dos grupos veículo e NF-10 precisam ser feitas, avaliando se a NF-10 é capaz de gerar neuroproteção nos animais tratados por ela.

Sendo assim, o modelo de 6-OHDA com infusão unilateral no estriado gerou sinais tipo ansioso e déficits cognitivos sem a presença de comprometimento motor. Mostrando novas possibilidades, com mais sinais não-motores precisando serem avaliados para melhor compressão da capacidade de replicar aspectos da DP. Além disso, a NF-10 mostrou estabilidade físico-química e potencial ansiolítico. No entanto, não foi possível reverter os efeitos de toxicidade que já haviam sido observados previamente. Dessa forma, tanto a nanocápsula quanto o peptídeo requerem mais estudos visando seu aperfeiçoamento.

6. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a nanopartícula NF-10 formulada nesse trabalho, manteve sua integridade em relação aos aspectos físico-químicos pelo período de 120 dias. O peptídeo se mostrou sem toxicidade tanto na sua forma nanoencapsulada quanto na sua forma livre, exceto pela maior dose nanoencapsulada. Em relação ao modelo não-motor da DP induzido pela injeção estriatal de 6-OHDA, primeiramente, foi padronizado o teste de reconhecimento de objeto novo. O modelo de 6-OHDA com infusão unilateral no estriado foi capaz de gerar sinais do tipo ansioso, sem a presença de sinais motores. Dessa forma, apresentando dados que ainda não tinham sido obtidos na literatura. Além disso, o modelo também apresentou déficits cognitivos. Esse trabalho foi capaz de produzir um modelo não-motor que pode enriquecer as análises pré-clínicas e a avaliação de novos tratamentos. No que se trata sobre a atividade terapêutica da NF-10, ela demonstrou uma capacidade de reverter parcialmente o comportamento do tipo ansioso causado pela 6-OHDA. No entanto, nenhuma melhora cognitiva foi observada em relação ao grupo 6-OHDA. Além disso, apesar de não ter demonstrado déficits motores nessa dose no Rotarod no protocolo de toxicidade de dose única, a dose mostrou exacerbar questões motoras no OF. Embora o uso da nanotecnologia não ter sido capaz de reverter totalmente o efeito neurotóxico da Fra-10, a NF-10 se mostrou promissora no tratamento de sinais não-motores da DP, em especial o efeito ansiolítico. Nesse sentido, o modelo padronizado nesse trabalho pode trazer novos aspectos para os estudos da DP, seus sinais e tratamentos, particularmente por ser um modelo de lesão estriatal unilateral e capaz de gerar sinais do tipo ansioso e déficit cognitivo sem a influência de sinais motores, de forma a replicar alguns aspectos da DP em fase prodrômica, podendo ser uma promissora fonte para estudos pré-clínicos.

7. REFERÊNCIAS

- AARSLAND, D.; ANDERSEN, K.; LARSEN, J. P.; LOLK, A.; NIELSEN, H.; KRAGH-SØRENSEN, P. Risk of dementia in Parkinson's disease: a community-based, prospective study. **Neurology**, v. 56, n. 6, p. 730–736, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1212/WNL.56.6.730>. Acesso em: 14 jul. 2025.
- AARSLAND, D.; BATZU, L.; HALLIDAY, G. M.; GEURTSSEN, G. J.; BALLARD, C.; RAY CHAUDHURI, K.; WEINTRAUB, D. Parkinson disease-associated cognitive impairment. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00280-3>
- AGRAWAL, M.; SARAF, S.; SARAF, S.; ANTIMISIARIS, S. G.; CHOUGULE, M. B.; SHOYELE, S. A.; ALEXANDER, A. Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 281, p. 139–177, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2018.05.011>. Acesso em: 14 jul. 2025.
- ALABRAHIM, O. A. A.; AZZAZY, H. M. E. S. Polymeric nanoparticles for dopamine and levodopa replacement in Parkinson's disease. **Nanoscale Advances**, v. 4, n. 24, p. 5233–5244, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D2NA00524G>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- ALAHMARI, A. **Blood-Brain Barrier Overview: Structural and Functional Correlation**. [S. l.]: Hindawi Limited, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2021/6564585>
- ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive Processing**, v. 13, n. 2, p. 93, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S10339-011-0430-Z>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- ARAI, N.; MISUGI, K.; GOSHIMA, Y.; MISU, Y. Evaluation of a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated C57 black mouse model for parkinsonism. **Brain Research**, v. 515, n. 1–2, p. 57–63, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90576-W](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90576-W). Acesso em: 13 jul. 2025.
- ARCHIBALD, N. K.; CLARKE, M. P.; MOSIMANN, U. P.; BURN, D. J. Visual symptoms in Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 26, n. 13, p. 2387–2395, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/MDS.23891>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- ARISOY, S.; SAYINER, O.; COMOGLU, T.; ONAL, D.; ATALAY, O.; PEHLIVANOGLU, B. In vitro and in vivo evaluation of levodopa-loaded nanoparticles for nose to brain delivery.

Pharmaceutical Development and Technology, v. 25, n. 6, p. 735–747, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10837450.2020.1740257>. Acesso em: 13 jul. 2025.

ARMSTRONG, M. J.; OKUN, M. S. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. **JAMA**, v. 323, n. 6, p. 548–560, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/JAMA.2019.22360>. Acesso em: 13 jul. 2025.

ATHAUDA, D. *et al.* Exenatide once weekly versus placebo in Parkinson's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 390, n. 10103, p. 1664–1675, 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31585-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31585-4). Acesso em: 13 jul. 2025.

BALDERESCHI, M.; DI CARLO, A.; ROCCA, W. A.; VANNI, P.; MAGGI, S.; PERISSINOTTO, E.; GRIGOLETTO, F.; AMADUCCI, L.; INZITARI, D. Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. **Neurology**, v. 55, n. 9, p. 1358–1363, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1212/WNL.55.9.1358>. Acesso em: 13 jul. 2025.

BARBEAU, A.; DALLAIRE, L.; BUU, N. T.; POIRIER, J.; RUCINSKA, E. Comparative behavioral, biochemical and pigmentary effects of MPTP, MPP+ and paraquat in rana pipiens. **Life Sciences**, v. 37, n. 16, p. 1529–1538, 1985. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(85\)90185-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(85)90185-7). Acesso em: 14 jul. 2025.

BARONE, P. *et al.* The PRIAMO study: A multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 24, n. 11, p. 1641–1649, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/MDS.22643>. Acesso em: 13 jul. 2025.

BEN-SHLOMO, Y.; DARWEESH, S.; LLIBRE-GUERRA, J.; MARRAS, C.; SAN LUCIANO, M.; TANNER, C. **The epidemiology of Parkinson's disease**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2024. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01419-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01419-8)

BETANCOURT, E.; WACHTEL, J.; MICHAELLOS, M.; HAGGERTY, M.; CONFORTI, J.; KRITZER, M. F. The impact of biological sex and sex hormones on cognition in a rat model of early, pre-motor Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 345, p. 297–314, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2016.05.041>. Acesso em: 13 jul. 2025.

BETARBET, R.; SHERER, T. B.; MACKENZIE, G.; GARCIA-OSUNA, M.; PANOV, A. V.; GREENAMYRE, J. T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 1301–1306, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/81834>. Acesso em: 14 jul. 2025.

BHARDWAJ, H.; JANGDE, R. K. Current updated review on preparation of polymeric nanoparticles for drug delivery and biomedical applications. **Next Nanotechnology**, v. 2, p. 100013, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.NXNANO.2023.100013>. Acesso em: 13 jul. 2025.

BICHLER, Z.; LIM, H. C.; ZENG, L.; TAN, E. K. Non-Motor and Motor Features in LRRK2 Transgenic Mice. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, p. e70249, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0070249>. Acesso em: 13 jul. 2025.

BIOLCHI, A. M.; DE OLIVEIRA, D. G. R.; DE OLIVEIRA AMARAL, H.; ALVES CAMPOS, G. A.; GONÇALVES, J. C.; DE SOUZA, A. C. B.; ROBALINHO LIMA, M.; PAULINO SILVA, L.; RENATA MORTARI, M. Fraternine, a Novel Wasp Peptide, Protects against Motor Impairments in 6-OHDA Model of Parkinsonism. **Toxins 2020, Vol. 12, Page 550**, v. 12, n. 9, p. 550, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/TOXINS12090550>. Acesso em: 13 jul. 2025.

BIRKMAYER, W.; HORNYKIEWICZ, O. [The L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) effect in Parkinson's syndrome in man: On the pathogenesis and treatment of Parkinson akinesia]. **Archiv fur Psychiatrie und Nervenkrankheiten, vereinigt mit Zeitschrift fur die gesamte Neurologie und Psychiatrie**, v. 203, n. 5, p. 560–574, 1962. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00343235>. Acesso em: 13 jul. 2025.

BLOEM, B. R.; OKUN, M. S.; KLEIN, C. Parkinson's disease. **Lancet (London, England)**, v. 397, n. 10291, p. 2284–2303, 2021. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00218-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00218-X). Acesso em: 13 jul. 2025.

BLUM-DEGENA, D.; MÜLLER, T.; KUHN, W.; GERLACH, M.; PRZUNTEK, H.; RIEDERER, P. Interleukin-1 β and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. **Neuroscience Letters**, v. 202, n. 1–2, p. 17–20, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)12192-7](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)12192-7). Acesso em: 13 jul. 2025.

BOHNEN, N. I.; STUDENSKI, S. A.; CONSTANTINE, G. M.; MOORE, R. Y. Diagnostic performance of clinical motor and non-motor tests of Parkinson disease: a matched case-control study. **European journal of neurology**, v. 15, n. 7, p. 685–691, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1468-1331.2008.02148.X>. Acesso em: 13 jul. 2025.

BONITO-OLIVA, A.; PIGNATELLI, M.; SPIGOLON, G.; YOSHITAKE, T.; SEILER, S.; LONGO, F.; PICCININ, S.; KEHR, J.; MERCURI, N. B.; NISTICÒ, R.; FISONE, G. Cognitive impairment and dentate gyrus synaptic dysfunction in experimental Parkinsonism. **Biological**

- Psychiatry**, v. 75, n. 9, p. 701–710, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.02.015>
- BRAAK, H.; DEL TREDICI, K.; RÜB, U.; DE VOS, R. A. I.; JANSEN STEUR, E. N. H.; BRAAK, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 2, p. 197–211, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9). Acesso em: 13 jul. 2025.
- BROEN, M. P. G.; NARAYEN, N. E.; KUIJF, M. L.; DISSANAYAKA, N. N. W.; LEENTJENS, A. F. G. Prevalence of anxiety in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. **Movement Disorders**, v. 31, n. 8, p. 1125–1133, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/MDS.26643>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- BROOKS, A. I.; CHADWICK, C. A.; GELBARD, H. A.; CORY-SLECHTA, D. A.; FEDEROFF, H. J. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. **Brain Research**, v. 823, n. 1–2, p. 1–10, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)01192-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)01192-5). Acesso em: 14 jul. 2025.
- BURLEC, A. F.; CORCIOVA, A.; BOEV, M.; BATIR-MARIN, D.; MIRCEA, C.; CIOANCA, O.; DANILA, G.; DANILA, M.; BUCUR, A. F.; HANCIANU, M. Current Overview of Metal Nanoparticles' Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications, with a Focus on Silver and Gold Nanoparticles. **Pharmaceuticals 2023, Vol. 16, Page 1410**, v. 16, n. 10, p. 1410, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/PH16101410>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- CAPELA, J. P.; SCHIFANO, F.; KRSEK, A.; BATICIC, L. Nanotechnology-Driven Therapeutic Innovations in Neurodegenerative Disorders: A Focus on Alzheimer's and Parkinson's Disease. **Future Pharmacology 2024, Vol. 4, Pages 352-379**, v. 4, n. 2, p. 352–379, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/FUTUREPHARMACOL4020020>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. **Nature 1957 180:4596**, v. 180, n. 4596, p. 1200–1200, 1957. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/1801200a0>. Acesso em: 14 jul. 2025.
- CHAKRABORTY, P.; BHATTACHARYYA, C.; SAHU, R.; DUA, T. K.; KANDIMALLA, R.; DEWANJEE, S. Polymeric nanotherapeutics: An emerging therapeutic approach for the management of neurodegenerative disorders. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 91, p. 105267, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2023.105267>. Acesso em: 13 jul. 2025.

- CHAUDHURI, K. R. *et al.* International multicenter pilot study of the first comprehensive self-completed nonmotor symptoms questionnaire for Parkinson's disease: The NMSQuest study. **Movement Disorders**, v. 21, n. 7, p. 916–923, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/MDS.20844>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- CHAUDHURI, K. R.; MARTINEZ-MARTIN, P. Quantitation of non-motor symptoms in Parkinson's disease. **European Journal of Neurology**, v. 15, n. SUPPL.2, p. 2–8, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1468-1331.2008.02212.X>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- CHAUDHURI, K. R.; YATES, L.; MARTINEZ-MARTIN, P. The non-motor symptom complex of Parkinson's disease: a comprehensive assessment is essential. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 5, n. 4, p. 275–283, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S11910-005-0072-6>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- CHEN, L.; DELTHEIL, T.; TURLE-LORENZO, N.; LIBERGE, M.; ROSIER, C.; WATABE, I.; SRENG, L.; AMALRIC, M.; MOURRE, C. SK channel blockade reverses cognitive and motor deficits induced by nigrostriatal dopamine lesions in rats. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 8, p. 1295–1306, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1461145714000236>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- CHIA, S. J.; TAN, E. K.; CHAO, Y. X. **Historical perspective: Models of Parkinson's disease**. [S. l.]: MDPI AG, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21072464>
- CLARKE, E.; JANTRACHOTECHATCHAWAN, C.; BUHIDMA, Y.; BROADSTOCK, M.; YU, L.; HOWLETT, D.; AARSLAND, D.; BALLARD, C.; FRANCIS, P. T. Age-related neurochemical and behavioural changes in D409V/WT GBA1 mouse: Relevance to lewy body dementia. **Neurochemistry International**, v. 129, p. 104502, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2019.104502>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- COUVREUR, P.; TULKENST, P.; ROLAND, M.; TROUET, A.; SPEISER, P. Nanocapsules: A new type of lysosomotropic carrier. **FEBS Letters**, v. 84, n. 2, p. 323–326, 1977. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(77\)80717-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(77)80717-5). Acesso em: 13 jul. 2025.
- CROWN, L. M.; BARTLETT, M. J.; WIEGAND, J. P. L.; EBY, A. J.; MONROE, E. J.; GIES, K.; WOHLFORD, L.; FELL, M. J.; FALK, T.; COWEN, S. L. Sleep Spindles and Fragmented Sleep as Prodromal Markers in a Preclinical Model of LRRK2-G2019S Parkinson's Disease. **Frontiers in Neurology**, v. 11, p. 519148, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2020.00324/BIBTEX>. Acesso em: 13 jul. 2025.

- CUI, J.; ZHAO, D.; XU, M.; LI, Z.; QIAN, J.; SONG, N.; WANG, J.; XIE, J. Characterization of graded 6-Hydroxydopamine unilateral lesion in medial forebrain bundle of mice. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54066-0>
- CZERNICZYNIEC, A.; KARADAYIAN, A. G.; BUSTAMANTE, J.; CUTRERA, R. A.; LORES-ARNAIZ, S. Paraquat induces behavioral changes and cortical and striatal mitochondrial dysfunction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 7, p. 1428–1436, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2011.06.034>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- DAMIER, P.; HIRSCH, E. C.; AGID, Y.; GRAYBIEL, A. M. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. **Brain : a journal of neurology**, v. 122 (Pt 8), n. 8, p. 1437–1448, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/BRAIN/122.8.1437>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- DAS, T.; RAMEZANI, M.; SNEAD, D.; FOLLMER, C.; CHUNG, P.; LEE, K. Y.; HOLOWKA, D. A.; BAIRD, B. A.; ELIEZER, D. The Role of Membrane Affinity and Binding Modes in Alpha-Synuclein Regulation of Vesicle Release and Trafficking. **Biomolecules**, v. 12, n. 12, p. 1816, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/BIOM12121816/S1>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- DENNINGER, J. K.; SMITH, B. M.; KIRBY, E. D. **Novel Object Recognition and Object Location Behavioral Testing in Mice on a Budget**. [S. l.: s. n.]. Disponível em: <https://www.jove.com/video/58593/>.
- DEVI, L.; RAGHAVENDRAN, V.; PRABHU, B. M.; AVADHANI, N. G.; ANANDATHEERTHAVARADA, H. K. Mitochondrial import and accumulation of α -synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 14, p. 9089–9100, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/JBC.M710012200/ASSET/EF08DCB-D521-4D18-802C-1AA37BF819D9/MAIN.ASSETS/GR8.JPG>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- DIJKSTRA, A. A.; VOORN, P.; BERENDSE, H. W.; GROENEWEGEN, H. J.; ROZEMULLER, A. J. M.; VAN DE BERG, W. D. J. Stage-dependent nigral neuronal loss in incidental Lewy body and parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 29, n. 10, p. 1244–1251, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds.25952>
- DIN, F. U.; AMAN, W.; ULLAH, I.; QURESHI, O. S.; MUSTAPHA, O.; SHAFIQUE, S.; ZEB, A. **Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected**

tumors. [S. l.]: Dove Medical Press Ltd., 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IJN.S146315>

DOREMUS, T. L.; VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Factor analysis of elevated plus-maze behavior in adolescent and adult rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, n. 4, p. 570–577, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2006.03.019>. Acesso em: 13 jul. 2025.

DOVONOU, A.; BOLDUC, C.; SOTO LINAN, V.; GORA, C.; PERALTA, M. R.; LÉVESQUE, M. **Animal models of Parkinson's disease: bridging the gap between disease hallmarks and research questions.** [S. l.]: BioMed Central Ltd, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40035-023-00368-8>

EARLS, R. H.; MENEES, K. B.; CHUNG, J.; BARBER, J.; GUTEKUNST, C. A.; HAZIM, M. G.; LEE, J. K. Intrastriatal injection of preformed alpha-synuclein fibrils alters central and peripheral immune cell profiles in non-transgenic mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 1–15, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/S12974-019-1636-8/FIGURES/7>. Acesso em: 13 jul. 2025.

ERRO, R. *et al.* Non-motor symptoms in early Parkinson's disease: a 2-year follow-up study on previously untreated patients. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 84, n. 1, p. 14–17, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/JNNP-2012-303419>. Acesso em: 13 jul. 2025.

FABER, W. M. The nasal mucosa and the subarachnoid space. **American Journal of Anatomy**, v. 62, n. 1, p. 121–148, 1937. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/AJA.1000620106>. Acesso em: 14 jul. 2025.

FEIGIN, V. L. *et al.* Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet. Neurology**, v. 18, n. 5, p. 459–480, 2019. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30499-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30499-X). Acesso em: 13 jul. 2025.

FERMAN, T. J. *et al.* Inclusion of RBD improves the diagnostic classification of dementia with Lewy bodies. **Neurology**, v. 77, n. 9, p. 875–882, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1212/WNL.0B013E31822C9148>. Acesso em: 13 jul. 2025.

FREY, W. H.; LIU, J.; CHEN, X.; THORNE, R. G.; FAWCETT, J. R.; ALA, T. A.; RAHMAN, Y. E. Delivery of 125I-NGF to the Brain via the Olfactory Route. **Drug Delivery**, v. 4, n. 2, p. 87–92, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/10717549709051878>. Acesso em: 14 jul. 2025.

GALLEGO-URREA, J. A.; TUORINIEMI, J.; HASSELLÖV, M. Applications of particle-tracking analysis to the determination of size distributions and concentrations of nanoparticles in environmental, biological and food samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 3, p. 473–483, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2011.01.005>. Acesso em: 13 jul. 2025.

GAO, X.; WU, B.; ZHANG, Q.; CHEN, J.; ZHU, J.; ZHANG, W.; RONG, Z.; CHEN, H.; JIANG, X. Brain delivery of vasoactive intestinal peptide enhanced with the nanoparticles conjugated with wheat germ agglutinin following intranasal administration. **Journal of Controlled Release**, v. 121, n. 3, p. 156–167, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2007.05.026>. Acesso em: 14 jul. 2025.

GARCIA, P. *et al.* Neurodegeneration and neuroinflammation are linked, but independent of α -synuclein inclusions, in a seeding/spreading mouse model of Parkinson's disease. **bioRxiv**, p. 2020.08.05.237750, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.08.05.237750>. Acesso em: 13 jul. 2025.

GARCÍA-GARCÍA, F.; PONCE, S.; BROWN, R.; CUSSEN, V.; KRUEGER, J. M. Sleep disturbances in the rotenone animal model of Parkinson disease. **Brain Research**, v. 1042, n. 2, p. 160–168, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2005.02.036>. Acesso em: 13 jul. 2025.

GIASSON, B. I.; DUDA, J. E.; QUINN, S. M.; ZHANG, B.; TROJANOWSKI, J. Q.; LEE, V. M. Y. Neuronal α -synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human α -synuclein. **Neuron**, v. 34, n. 4, p. 521–533, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00682-7/ATTACHMENT/2B96F94E-2948-4ED6-A609-105CD067E694/MMC4.JPG](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00682-7/ATTACHMENT/2B96F94E-2948-4ED6-A609-105CD067E694/MMC4.JPG). Acesso em: 13 jul. 2025.

GJERSTAD, M. D.; WENTZEL-LARSEN, T.; AARSLAND, D.; LARSEN, J. P. Insomnia in Parkinson's disease: frequency and progression over time. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 78, n. 5, p. 476–479, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/JNNP.2006.100370>. Acesso em: 13 jul. 2025.

GOETZ, C. G.; EMRE, M.; DUBOIS, B. Parkinson's disease dementia: definitions, guidelines, and research perspectives in diagnosis. **Annals of neurology**, v. 64 Suppl 2, n. S2, p. S81–S92, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ANA.21455>. Acesso em: 13 jul. 2025.

GOLDMAN, J. G. **Non-motor Symptoms and Treatments in Parkinson's Disease**. [S. l.]: W.B. Saunders, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2024.12.008>

GRASSI, D.; HOWARD, S.; ZHOU, M.; DIAZ-PEREZ, N.; URBAN, N. T.; GUERRERO-GIVEN, D.; KAMASAWA, N.; VOLPICELLI-DALEY, L. A.; LOGRASSO, P.; LASMÉZAS, C. I. Identification of a highly neurotoxic α -synuclein species inducing mitochondrial damage and mitophagy in Parkinson's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 11, p. E2634–E2643, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1073/PNAS.1713849115/SUPPL_FILE/PNAS.1713849115.SM01.AVI.

Acesso em: 13 jul. 2025.

GRAVÁN, P.; AGUILERA-GARRIDO, A.; MARCHAL, J. A.; NAVARRO-MARCHAL, S. A.; GALISTEO-GONZÁLEZ, F. **Lipid-core nanoparticles: Classification, preparation methods, routes of administration and recent advances in cancer treatment**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102871>

GROS, P.; VIDENOVIC, A. **Overview of Sleep and Circadian Rhythm Disorders in Parkinson Disease**. [S. l.]: W.B. Saunders, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.09.005>

GROSPE, G. M.; BAKER, P. M.; RAGOZZINO, M. E. Cognitive Flexibility Deficits Following 6-OHDA Lesions of the Rat Dorsomedial Striatum. **Neuroscience**, v. 374, p. 80–90, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2018.01.032/ASSET/004D6FE1-1889-43E6-919C-FF2F9DDB1F06/MAIN.ASSETS/GR4.JPG>. Acesso em: 13 jul. 2025.

GUIMARÃES, R. P.; RESENDE, M. C. S. de; TAVARES, M. M.; BELARDINELLI DE AZEVEDO, C.; RUIZ, M. C. M.; MORTARI, M. R. **Construct, Face, and Predictive Validity of Parkinson's Disease Rodent Models**. [S. l.]: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25168971>

HAGELL, P.; NORDLING, S.; REIMER, J.; GRABOWSKI, M.; PERSSON, U. Resource use and costs in a Swedish cohort of patients with Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 17, n. 6, p. 1213–1220, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/MDS.10262>. Acesso em: 13 jul. 2025.

HARMS, A. S.; DELIC, V.; THOME, A. D.; BRYANT, N.; LIU, Z.; CHANDRA, S.; JURKUVENAITE, A.; WEST, A. B. α -Synuclein fibrils recruit peripheral immune cells in the rat brain prior to neurodegeneration. **Acta neuropathologica communications**, v. 5, n. 1, p. 85, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/S40478-017-0494-9/FIGURES/7>. Acesso em: 13 jul. 2025.

- HAYES, M. T. **Parkinson's Disease and Parkinsonism**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.03.001>
- HELY, M. A.; REID, W. G. J.; ADENA, M. A.; HALLIDAY, G. M.; MORRIS, J. G. L. The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 23, n. 6, p. 837–844, 2008 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/MDS.21956>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- HELY, M. A.; REID, W. G. J.; ADENA, M. A.; HALLIDAY, G. M.; MORRIS, J. G. L. The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 23, n. 6, p. 837–844, 2008 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/MDS.21956>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J. E.; BENOIT, J. P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, n. 23, p. 4283–4300, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00331-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00331-4). Acesso em: 13 jul. 2025.
- HOU, L.; SUN, F.; HUANG, R.; SUN, W.; ZHANG, D.; WANG, Q. Inhibition of NADPH oxidase by apocynin prevents learning and memory deficits in a mouse Parkinson's disease model. **Redox Biology**, v. 22, p. 101134, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2019.101134>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- HU, S.; HU, M.; LIU, J.; ZHANG, B.; ZHANG, Z.; ZHOU, F. H.; WANG, L.; DONG, J. Phosphorylation of Tau and α -Synuclein Induced Neurodegeneration in MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 16, p. 651, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/NDT.S235562>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- HUNT, J.; COULSON, E. J.; RAJNARAYANAN, R.; OSTER, H.; VIDENOVIC, A.; RAWASHDEH, O. **Sleep and circadian rhythms in Parkinson's disease and preclinical models**. [S. l.]: BioMed Central Ltd, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13024-021-00504-w>
- HURT, C. S.; RIXON, L.; CHAUDHURI, K. R.; MOSS-MORRIS, R.; SAMUEL, M.; BROWN, R. G. Barriers to reporting non-motor symptoms to health-care providers in people with Parkinson's. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 64, p. 220–225, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.PARKRELDIS.2019.04.014>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- JANEZIC, S. *et al.* Deficits in dopaminergic transmission precede neuron loss and dysfunction in a new Parkinson model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 42, p. E4016–E4025, 2013. Disponível em:

https://doi.org/10.1073/PNAS.1309143110/SUPPL_FILE/SM02.MPG. Acesso em: 13 jul. 2025.

JANZ, C.; TIMPKA, J.; ROSQVIST, K.; PAUL, G.; STORCH, A.; ODIN, P. Non-Motor Symptom Management: Insights into Adherence to Treatment Guidelines in Parkinson's Disease Patients. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 14, n. 2, p. 297–312, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/JPD-230263>

JING, X.-Z.; YUAN, X.-Z.; LUO, X.; ZHANG, S.-Y.; WANG, X.-P. An Update on Nondopaminergic Treatments for Motor and Non-motor Symptoms of Parkinson's Disease. **Current Neuropharmacology**, v. 21, n. 8, p. 1806–1826, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1570159x20666220222150811>

JING, X.-Z.; YUAN, X.-Z.; LUO, X.; ZHANG, S.-Y.; WANG, X.-P. An Update on Nondopaminergic Treatments for Motor and Non-motor Symptoms of Parkinson's Disease. **Current neuropharmacology**, v. 21, n. 8, p. 1806–1826, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1570159X20666220222150811>. Acesso em: 14 jul. 2025.

KAUR, H.; CHAUHAN, S.; SANDHIR, R. Protective effect of lycopene on oxidative stress and cognitive decline in rotenone induced model of Parkinson's disease. **Neurochemical Research**, v. 36, n. 8, p. 1435–1443, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S11064-011-0469-3/METRICS>. Acesso em: 13 jul. 2025.

KECK, C. M.; SPECHT, D.; BRÜSSLER, J. Influence of lipid matrix composition on biopharmaceutical properties of lipid nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 338, p. 149–163, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2021.08.016>. Acesso em: 13 jul. 2025.

KEMPSTER, P. A.; O'SULLIVAN, S. S.; HOLTON, J. L.; REVESZ, T.; LEES, A. J. Relationships between age and late progression of Parkinson's disease: a clinico-pathological study. **Brain**, v. 133, n. 6, p. 1755–1762, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWQ059>. Acesso em: 13 jul. 2025.

KHAIRNAR, B. D.; JHA, A.; RAJWADE, J. M. Rationally designed cyclic peptides and nanomaterials as 'next-generation' anti-amyloid therapeutics. **Journal of Materials Science** **2023 58:24**, v. 58, n. 24, p. 9834–9860, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S10853-023-08654-6>. Acesso em: 13 jul. 2025.

KHOO, T. K.; YARNALL, A. J.; DUNCAN, G. W.; COLEMAN, S.; O'BRIEN, J. T.; BROOKS, D. J.; BARKER, R. A.; BURN, D. J. The spectrum of nonmotor symptoms in early

- Parkinson disease. **Neurology**, v. 80, n. 3, p. 276–281, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1212/WNL.0B013E31827DEB74>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- KIM, A.; KIM, H. J.; SHIN, C. W.; KIM, A.; KIM, Y.; JANG, M.; JUNG, Y. J.; LEE, W. W.; PARK, H.; JEON, B. Emergence of non-motor fluctuations with reference to motor fluctuations in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 54, p. 79–83, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.PARKRELDIS.2018.04.020>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- KIM, J. *et al.* Pharmacological Rescue with SR8278, a Circadian Nuclear Receptor REV-ERB α Antagonist as a Therapy for Mood Disorders in Parkinson's Disease. **Neurotherapeutics**, v. 19, n. 2, p. 592–607, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S13311-022-01215-W/ATTACHMENT/F3E0AE59-8DAF-4BDE-85D6-4F8CD3F45681/MMC21.PDF>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- KIM, S. *et al.* Transneuronal Propagation of Pathologic α -Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease. **Neuron**, v. 103, n. 4, p. 627–641.e7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2019.05.035>. Acesso em: 15 jul. 2025.
- KIM, W. G.; MOHNEY, R. P.; WILSON, B.; JEOHN, G. H.; LIU, B.; HONG, J. S. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 16, p. 6309–6316, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-16-06309.2000>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- KIRIK, D.; ROSENBLAD, C.; BURGER, C.; LUNDBERG, C.; JOHANSEN, T. E.; MUZYCZKA, N.; MANDEL, R. J.; BJÖRKLUND, A. Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 7, p. 2780–2791, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-07-02780.2002>. Acesso em: 14 jul. 2025.
- KITADA, T.; ASAKAWA, S.; HATTORI, N.; MATSUMINE, H.; YAMAMURA, Y.; MINOSHIMA, S.; YOKOCHI, M.; MIZUNO, Y.; SHIMIZU, N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature**, v. 392, n. 6676, p. 605–608, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/33416>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- KNUDSEN, K.; KROGH, K.; ØSTERGAARD, K.; BORGHAMMER, P. Constipation in parkinson's disease: Subjective symptoms, objective markers, and new perspectives. **Movement Disorders**, v. 32, n. 1, p. 94–105, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/MDS.26866>. Acesso em: 13 jul. 2025.

- KRISHNAN, S.; SARMA, G.; SARMA, S.; KISHORE, A. Do nonmotor symptoms in Parkinson's disease differ from normal aging? **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 26, n. 11, p. 2110–2113, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/MDS.23826>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- KUMAR, S.; BHARADWAJ, H.; SAHA, S.; SINGH, K.; KUMAR, P.; ARORA, S.; CHANDRA, D.; VIJ, D.; SRIVASTAVA, S.; GUPTA, K.; SRIVASTAVA, A. The Present Difficulties and Potential Benefits of Dopaminergic Agents in Parkinson's Disease Treatment. **Current Psychopharmacology**, v. 12, n. 1, p. 121–134, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/0122115560332182241031050521>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- KUPSCH, A.; SCHMIDT, W.; GIZATULLINA, Z.; DEBSKA-VIELHABER, G.; VOGES, J.; STRIGGOW, F.; PANTHER, P.; SCHWEGLER, H.; HEINZE, H. J.; VIELHABER, S.; GELLERICH, F. N. 6-Hydroxydopamine impairs mitochondrial function in the rat model of Parkinson's disease: Respirometric, histological, and behavioral analyses. **Journal of Neural Transmission**, v. 121, n. 10, p. 1245–1257, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00702-014-1185-3/METRICS>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- KWON, D. K.; KWATRA, M.; WANG, J.; KO, H. S. **Levodopa-Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease: Pathogenesis and Emerging Treatment Strategies**. [S. l.]: MDPI, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells11233736>
- LAMA, J.; BUHIDMA, Y.; FLETCHER, E. J. R.; DUTY, S. Animal models of Parkinson's disease: a guide to selecting the optimal model for your research. **Neuronal Signaling**, v. 5, n. 4, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/NS20210026>
- LANGSTON, J. W. **The MPTP story**. [S. l.]: IOS Press, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/JPD-179006>
- LEÃO, A. H. F. F.; SARMENTO-SILVA, A. J.; SANTOS, J. R.; RIBEIRO, A. M.; SILVA, R. H. Molecular, Neurochemical, and Behavioral Hallmarks of Reserpine as a Model for Parkinson's Disease: New Perspectives to a Long-Standing Model. **Brain pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 25, n. 4, p. 377–390, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/BPA.12253>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- LEE, D. H.; WOO, B. S.; PARK, Y. H.; LEE, J. H. General Treatments Promoting Independent Living in Parkinson's Patients and Physical Therapy Approaches for Improving Gait—A Comprehensive Review. **Medicina** 2024, Vol. 60, Page 711, v. 60, n. 5, p. 711, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/MEDICINA60050711>. Acesso em: 13 jul. 2025.

- LEROI, I.; MCDONALD, K.; PANTULA, H.; HARBISHETTAR, V. Cognitive impairment in Parkinson disease: impact on quality of life, disability, and caregiver burden. **Journal of geriatric psychiatry and neurology**, v. 25, n. 4, p. 208–214, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0891988712464823>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- LETONA, C. A. M.; LUO, K.; JEONG, K. B.; ADRA, H. J.; PARK, C. S.; KIM, Y. R. Effect of Lecithin on the Spontaneous Crystallization of Enzymatically Synthesized Short-Chain Amylose Molecules into Spherical Microparticles. **Polymers** **2019**, Vol. **11**, Page **264**, v. 11, n. 2, p. 264, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/POLYM11020264>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- LINDESTAM ARLEHAMN, C. S. *et al.* α -Synuclein-specific T cell reactivity is associated with preclinical and early Parkinson's disease. **Nature communications**, v. 11, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/S41467-020-15626-W>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- LITVAN, I. *et al.* Diagnostic criteria for mild cognitive impairment in Parkinson's disease: Movement Disorder Society Task Force guidelines. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 27, n. 3, p. 349–356, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/MDS.24893>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- LIX, L. M.; HOBSON, D. E.; AZIMAE, M.; LESLIE, W. D.; BURCHILL, C.; HOBSON, S. Socioeconomic variations in the prevalence and incidence of Parkinson's disease: a population-based analysis. **Journal of epidemiology and community health**, v. 64, n. 4, p. 335–340, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/JECH.2008.084954>. Acesso em: 15 jul. 2025.
- LOIRA-PASTORIZA, C.; TODOROFF, J.; VANBEVER, R. Delivery strategies for sustained drug release in the lungs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 75, p. 81–91, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2014.05.017>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- LUK, K. C.; KEHM, V. M.; ZHANG, B.; O'BRIEN, P.; TROJANOWSKI, J. Q.; LEE, V. M. Y. Intracerebral inoculation of pathological α -synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative α -synucleinopathy in mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 5, p. 975–986, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/JEM.20112457>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- MAAS, B. R.; GÖTTGENS, I.; TIJSSE KLASSEN, H. P. S.; KAPELLE, W. M.; RADDERS, D. L. M.; BLOEM, B. R.; POST, B.; DE VRIES, N. M.; DARWEESH, S. K. L. Age and gender differences in non-motor symptoms in people with Parkinson's disease. **Frontiers in Neurology**, v. 15, p. 1339716, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2024.1339716/BIBTEX>. Acesso em: 13 jul. 2025.

MAGEN, I.; TORRES, E. R.; DINH, D.; CHUNG, A.; MASLIAH, E.; CHESSELET, M. F. Social cognition impairments in mice overexpressing alpha-synuclein under the Thy1 promoter, a model of pre-manifest Parkinson's disease. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 5, n. 3, p. 669–680, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.3233/JPD-140503/ASSET/815402F6-6F44-4D7C-91DD-F90A49B7AF60/ASSETS/GRAPHIC/10.3233_JPD-140503-FIG4.JPG. Acesso em: 13 jul. 2025.

MAI, A. S.; CHAO, Y.; XIAO, B.; ZHOU, Z.; YONG, J. H.; LEE, A. R. Y. Bin; TAN, E. K. Risk of Suicidal Ideation and Behavior in Individuals With Parkinson Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **JAMA Neurology**, v. 81, n. 1, p. 10–18, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/JAMANEUROL.2023.4207>. Acesso em: 13 jul. 2025.

MALPARTIDA, A. B.; WILLIAMSON, M.; NARENDRA, D. P.; WADE-MARTINS, R.; RYAN, B. J. **Mitochondrial Dysfunction and Mitophagy in Parkinson's Disease: From Mechanism to Therapy**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.11.007>

MÄNNISTÖ, P. T.; KERÄNEN, T.; REINIKAINEN, K. J.; HANTTU, A.; POLLESELLO, P. The Catechol O-Methyltransferase Inhibitor Entacapone in the Treatment of Parkinson's Disease: Personal Reflections on a First-in-Class Drug Development Programme 40 Years On. **Neurology and Therapy**, v. 13, n. 4, p. 1039–1054, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S40120-024-00629-2/TABLES/4>. Acesso em: 13 jul. 2025.

MARRAS, C. *et al.* Improving Parkinson's Disease Care through Systematic Screening for Depression. **Movement Disorders Clinical Practice**, v. 11, n. 10, p. 1212–1222, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/MDC3.14163>. Acesso em: 13 jul. 2025.

MARSDEN, C. D.; PARKES, J. D. “ON-OFF” EFFECTS IN PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE ON CHRONIC LEVODOPA THERAPY. **The Lancet**, v. 307, n. 7954, p. 292–296, 1976. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(76\)91416-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(76)91416-1). Acesso em: 13 jul. 2025.

MARTIN, L. J.; PAN, Y.; PRICE, A. C.; STERLING, W.; COPELAND, N. G.; JENKINS, N. A.; PRICE, D. L.; LEE, M. K. Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 41–50, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4308-05.2006>. Acesso em: 13 jul. 2025.

MARTINEZ-MARTIN, P.; PECURARIU, C. F.; ODIN, P.; VAN HILTEN, J. J.; ANTONINI, A.; ROJO-ABUIN, J. M.; BORGES, V.; TRENKWALDER, C.; AARSLAND, D.; BROOKS,

- D. J.; CHAUDHURI, K. R. Gender-related differences in the burden of non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Journal of Neurology**, v. 259, n. 8, p. 1639–1647, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00415-011-6392-3/METRICS>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- MARTINEZ-MARTIN, P.; RODRIGUEZ-BLAZQUEZ, C.; KURTIS, M. M.; CHAUDHURI, K. R. The impact of non-motor symptoms on health-related quality of life of patients with Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 26, n. 3, p. 399–406, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/MDS.23462>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- MASINI, D.; BONITO-OLIVA, A.; BERTHO, M.; FISONE, G. Inhibition of mTORC1 signaling reverts cognitive and affective deficits in a mouse model of Parkinson's disease. **Frontiers in Neurology**, v. 9, n. APR, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00208>
- MASINI, D.; PLEWNIA, C.; BERTHO, M.; SCALBERT, N.; CAGGIANO, V.; FISONE, G. A guide to the generation of a 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease for the study of non-motor symptoms. **Biomedicines**, v. 9, n. 6, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9060598>
- MASLIAH, E.; ROCKENSTEIN, E.; VEINBERGS, I.; MALLORY, M.; HASHIMOTO, M.; TAKEDA, A.; SAGARA, Y.; SISK, A.; MUCKE, L. Dopaminergic Loss and Inclusion Body Formation in α -Synuclein Mice: Implications for Neurodegenerative Disorders. **Science**, v. 287, n. 5456, p. 1265–1269, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.287.5456.1265>. Acesso em: 14 jul. 2025.
- MAYER, A. B.; AMARAL, H. de O.; DE OLIVEIRA, D. G. R.; CAMPOS, G. A. A.; RIBEIRO, P. G.; FERNANDES, S. C. R.; DE SOUZA, A. C. B.; DE CASTRO, R. J. A.; BOCCA, A. L.; MORTARI, M. R. New fraternine analogues: Evaluation of the antiparkinsonian effect in the model of Parkinson's disease. **Neuropeptides**, v. 103, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.npep.2023.102390>
- MCDONALD, C.; GORDON, G.; HAND, A.; WALKER, R. W.; FISHER, J. M. 200 Years of Parkinson's disease: what have we learnt from James Parkinson? **Age and Ageing**, v. 47, n. 2, p. 209–214, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/AGEING/AFX196>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- MCGLINCHEY, R. P.; NI, X.; SHADISH, J. A.; JIANG, J.; LEE, J. C. The N terminus of α -synuclein dictates fibril formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 35, p. e2023487118, 2021. Disponível em:

https://doi.org/10.1073/PNAS.2023487118/SUPPL_FILE/PNAS.2023487118.SAPP.PDF.

Acesso em: 13 jul. 2025.

MCKEITH, I. G. *et al.* Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies. **Neurology**, v. 89, n. 1, p. 88–100, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004058>.

Acesso em: 13 jul. 2025.

MCKEITH, I. G. *et al.* Research criteria for the diagnosis of prodromal dementia with Lewy bodies. **Neurology**, v. 94, n. 17, p. 743–755, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000009323>. Acesso em: 13 jul. 2025.

MEDEIROS, D. de C.; PLEWNIA, C.; MENDES, R. V.; PISANÒ, C. A.; BOI, L.; MORAES, M. F. D.; AGUIAR, C. L.; FISONE, G. A mouse model of sleep disorders in Parkinson's disease showing distinct effects of dopamine D2-like receptor activation. **Progress in Neurobiology**, v. 231, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2023.102536>

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 83–101, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2012.09.021>. Acesso em: 13 jul. 2025.

MOEHLE, M. S.; WEST, A. B. M1 and M2 immune activation in Parkinson's Disease: Foe and ally? **Neuroscience**, v. 302, p. 59–73, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2014.11.018>. Acesso em: 13 jul. 2025.

MOGI, M.; HARADA, M.; RIEDERER, P.; NARABAYASHI, H.; FUJITA, K.; NAGATSU, T. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. **Neuroscience Letters**, v. 165, n. 1–2, p. 208–210, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90746-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90746-3). Acesso em: 13 jul. 2025.

MONGE-FUENTES, V. *et al.* Dopamine-loaded nanoparticle systems circumvent the blood–brain barrier restoring motor function in mouse model for Parkinson's Disease. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94175-8>

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1–2, p. 113–142, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2009.10.018>. Acesso em: 14 jul. 2025.

MORRIS, H. R.; SPILLANTINI, M. G.; SUE, C. M.; WILLIAMS-GRAY, C. H. The pathogenesis of Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 403, n. 10423, p. 293–304, 2024. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01478-2/ASSET/91B19D08-23D5-4D50-B57A-065F464C1052/MAIN.ASSETS/GR3.JPG](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01478-2/ASSET/91B19D08-23D5-4D50-B57A-065F464C1052/MAIN.ASSETS/GR3.JPG). Acesso em: 13 jul. 2025.

- MOURA, R. P.; PACHECO, C.; PÊGO, A. P.; DES RIEUX, A.; SARMENTO, B. Lipid nanocapsules to enhance drug bioavailability to the central nervous system. **Journal of Controlled Release**, v. 322, p. 390–400, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2020.03.042>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- MUDALIGE, T.; QU, H.; VAN HAUTE, D.; ANSAR, S. M.; PAREDES, A.; INGLE, T. Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges. *In: Nanomaterials for Food Applications*. [S. l.]: Elsevier, 2018. p. 313–353. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814130-4.00011-7>
- MULEIRO ALVAREZ, M.; CANO-HERRERA, G.; OSORIO MARTÍNEZ, M. F.; VEGA GONZALES-PORTILLO, J.; MONROY, G. R.; MURGUIONDO PÉREZ, R.; TORRES-RÍOS, J. A.; VAN TIENHOVEN, X. A.; GARIBALDI BERNOT, E. M.; ESPARZA SALAZAR, F.; IBARRA, A. **A Comprehensive Approach to Parkinson's Disease: Addressing Its Molecular, Clinical, and Therapeutic Aspects**. [S. l.]: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25137183>
- NAIR, A. B. *et al.* Intranasal Administration of Dolutegravir-Loaded Nanoemulsion-Based In Situ Gel for Enhanced Bioavailability and Direct Brain Targeting. **Gels**, v. 9, n. 2, p. 130, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/GELS9020130/S1>. Acesso em: 15 jul. 2025.
- NAREN, P.; CHOLKAR, A.; KAMBLE, S.; KHAN, S. S.; SRIVASTAVA, S.; MADAN, J.; MEHRA, N.; TIWARI, V.; SINGH, S. B.; KHATRI, D. K. **Pathological and Therapeutic Advances in Parkinson's Disease: Mitochondria in the Interplay**. [S. l.]: IOS Press BV, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/JAD-220682>
- NARENDRA, D. P.; JIN, S. M.; TANAKA, A.; SUEN, D. F.; GAUTIER, C. A.; SHEN, J.; COOKSON, M. R.; YOULE, R. J. PINK1 Is Selectively Stabilized on Impaired Mitochondria to Activate Parkin. **PLOS Biology**, v. 8, n. 1, p. e1000298, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1000298>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- NÈGRE-PAGÈS, L.; REGRAGUI, W.; BOUHASSIRA, D.; GRANDJEAN, H.; RASCOL, O. Chronic pain in Parkinson's disease: the cross-sectional French DoPaMiP survey. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 23, n. 10, p. 1361–1369, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/MDS.22142>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- NEUPANE, S.; DE CECCO, E.; AGUZZI, A. The Hidden Cell-to-Cell Trail of α -Synuclein Aggregates. **Journal of Molecular Biology**, v. 435, n. 12, p. 167930, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2022.167930>. Acesso em: 13 jul. 2025.

OLIVERAS-SALVÁ, M.; VAN DER PERREN, A.; CASADEI, N.; STROOBANTS, S.; NUBER, S.; D'HOOGE, R.; VAN DEN HAUTE, C.; BAEKELANDT, V. RAAV2/7 vector-mediated overexpression of alpha-synuclein in mouse substantia nigra induces protein aggregation and progressive dose-dependent neurodegeneration. **Molecular Neurodegeneration**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-44/FIGURES/6>. Acesso em: 13 jul. 2025.

OMBREDANE, A. S. *et al.* Nanoemulsion-based systems as a promising approach for enhancing the antitumoral activity of pequi oil (Caryocar brasiliense Cambess.) in breast cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 58, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101819>

PARK, S. Y.; YI, E. H.; KIM, Y.; PARK, G. <p>Anti-neuroinflammatory effects of Ephedra sinica Stapf extract-capped gold nanoparticles in microglia</p>. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 2861–2877, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IJN.S195218>. Acesso em: 13 jul. 2025.

PARKES, D. G.; MACE, K. F.; TRAUTMANN, M. E. Discovery and development of exenatide: the first antidiabetic agent to leverage the multiple benefits of the incretin hormone, GLP-1. **Expert opinion on drug discovery**, v. 8, n. 2, p. 219–244, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/17460441.2013.741580>. Acesso em: 13 jul. 2025.

PESSIGLIONE, M.; GUEHL, D.; JAN, C.; FRANÇOIS, C.; HIRSCH, E. C.; FÉGER, J.; TREMBLAY, L. Disruption of self-organized actions in monkeys with progressive MPTP-induced parkinsonism: II. Effects of reward preference. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 437–446, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.0953-816X.2003.03089.X>. Acesso em: 13 jul. 2025.

PICCA, A.; GUERRA, F.; CALVANI, R.; ROMANO, R.; JOSÉCOELHO-JÚNIOR, H.; BUCCI, C.; MARZETTI, E. **Mitochondrial dysfunction, protein misfolding and neuroinflammation in parkinson's disease: Roads to biomarker discovery**. [S. l.]: MDPI, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom11101508>

PIGOTT, K. *et al.* Longitudinal study of normal cognition in Parkinson disease. **Neurology**, v. 85, n. 15, p. 1276–1282, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002001>. Acesso em: 13 jul. 2025.

PISCHEDDA, F. *et al.* LRRK2 G2019S kinase activity triggers neurotoxic NSF aggregation. **Brain**, v. 144, n. 5, p. 1509–1525, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWAB073>. Acesso em: 13 jul. 2025.

- 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. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- POLYMEROPOULOS, M. H. *et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 276, n. 5321, p. 2045–2047, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.276.5321.2045>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- POSTUMA, R. B. *et al.* **MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease**. [S. l.]: John Wiley and Sons Inc, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds.26424>
- PRATES-RODRIGUES, M.; SCHWEIZER, B. L. A.; DE PAULA GOMES, C.; RIBEIRO, Â. M.; PADOVAN-NETO, F. E.; MASINI, D.; LOPES-AGUIAR, C. **Challenges and Opportunities in Exploring Non-Motor Symptoms in 6-Hydroxydopamine Models of Parkinson's Disease: A Systematic Review**. [S. l.]: John Wiley and Sons Inc, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jnc.70008>
- PURRI, R. *et al.* Subjective Cognitive Complaint in Parkinson's Disease Patients With Normal Cognition: Canary in the Coal Mine? **Movement Disorders**, v. 35, n. 9, p. 1618–1625, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/MDS.28115>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- QUINTANA, D. S.; GUASTELLA, A. J.; WESTLYE, L. T.; ANDREASSEN, O. A. The promise and pitfalls of intranasally administering psychopharmacological agents for the treatment of psychiatric disorders. **Molecular Psychiatry** **2016 21:1**, v. 21, n. 1, p. 29–38, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/mp.2015.166>. Acesso em: 14 jul. 2025.
- RAJ, K.; KAUR, P.; GUPTA, G. D.; SINGH, S. Metals associated neurodegeneration in Parkinson's disease: Insight to physiological, pathological mechanisms and management. **Neuroscience Letters**, v. 753, p. 135873, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2021.135873>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- RAMONET, D. *et al.* Dopaminergic Neuronal Loss, Reduced Neurite Complexity and Autophagic Abnormalities in Transgenic Mice Expressing G2019S Mutant LRRK2. **PLOS ONE**, v. 6, n. 4, p. e18568, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0018568>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- RANGANATH, A.; JACOB, S. N. Doping the Mind. **The Neuroscientist**, v. 22, n. 6, p. 593–603, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1073858415602850>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- RAO, R.; CARPENA-NÚÑEZ, J.; NIKOLAEV, P.; SUSNER, M. A.; REYES, K. G.; MARUYAMA, B. Advanced machine learning decision policies for diameter control of carbon

- nanotubes. **npj Computational Materials** **2021** **7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41524-021-00629-y>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- RAY CHAUDHURI, K.; LETA, V.; BANNISTER, K.; BROOKS, D. J.; SVENNINGSSON, P. **The noradrenergic subtype of Parkinson disease: from animal models to clinical practice.** [S. l.]: Nature Research, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41582-023-00802-5>
- REICHMANN, H. Real-world considerations regarding the use of the combination of levodopa, carbidopa, and entacapone (Stalevo®) in Parkinson's disease. **European Journal of Neurology**, v. 30, n. S2, p. 15–20, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ENE.15992>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- SAKANE, T.; AKIZUKI, M.; YOSHIDA, M.; YAMASHITA, S.; NADAI, T.; HASHIDA, M.; SEZAKI, H. Transport of cephalexin to the cerebrospinal fluid directly from the nasal cavity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 43, n. 6, p. 449–451, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.2042-7158.1991.TB03510.X>. Acesso em: 14 jul. 2025.
- SAMARIDOU, E.; ALONSO, M. J. Nose-to-brain peptide delivery – The potential of nanotechnology. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2888–2905, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.11.001>
- SANDOVAL-PISTORIUS, S. S.; HACKER, M. L.; WATERS, A. C.; WANG, J.; PROVENZA, N. R.; DE HEMPTINNE, C.; JOHNSON, K. A.; MORRISON, M. A.; CERNERA, S. Advances in Deep Brain Stimulation: From Mechanisms to Applications. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 43, n. 45, p. 7575–7586, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1427-23.2023>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- SANTOS-GARCÍA, D. *et al.* Sex Differences in Motor and Non-Motor Symptoms among Spanish Patients with Parkinson's Disease. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 4, p. 1329, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/JCM12041329/S1>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- SASIKUMAR, S.; STRAFELLA, A. P. Imaging Mild Cognitive Impairment and Dementia in Parkinson's Disease. **Frontiers in Neurology**, v. 11, p. 47, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2020.00047>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- SATEIA, M. J. International classification of sleep disorders-third edition: highlights and modifications. **Chest**, v. 146, n. 5, p. 1387–1394, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1378/CHEST.14-0970>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- SAVICA, R.; GROSSARDT, B. R.; BOWER, J. H.; ERIC AHLSSKOG, J.; ROCCA, W. A. Time Trends in the Incidence of Parkinson Disease. **JAMA neurology**, v. 73, n. 8, p. 981–989, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/JAMANEUROL.2016.0947>. Acesso em: 13 jul. 2025.

- SCARPA, E.; CASCIONE, M.; GRIEGO, A.; PELLEGRINO, P.; MOSCHETTI, G.; DE MATTEIS, V. Gold and silver nanoparticles in Alzheimer's and Parkinson's diagnostics and treatments. **Ibrain**, v. 9, n. 3, p. 298–315, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/IBRA.12126>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- SCHNEIDER, R. B.; AUINGER, P.; TAROLLI, C. G.; IOURINETS, J.; GIL-DÍAZ, M. C.; RICHARD, I. H. A trial of buspirone for anxiety in Parkinson's disease: Safety and tolerability. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 81, p. 69–74, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.PARKRELDIS.2020.10.020>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- SEPPI, K. *et al.* **Update on treatments for nonmotor symptoms of Parkinson's disease—an evidence-based medicine review**. [S. l.]: John Wiley and Sons Inc, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds.27602>
- SHAN, Y. *et al.* Evidence of a large current of transcranial alternating current stimulation directly to deep brain regions. **Molecular Psychiatry** **2023 28:12**, v. 28, n. 12, p. 5402–5410, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02150-8>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- SHARMA, M.; BURRÉ, J. α -Synuclein in synaptic function and dysfunction. **Trends in neurosciences**, v. 46, n. 2, p. 153–166, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2022.11.007>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- SHEN, Y. *et al.* Propagated α -synucleinopathy recapitulates REM sleep behaviour disorder followed by parkinsonian phenotypes in mice. **Brain**, v. 143, n. 11, p. 3374–3392, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWAA283>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- SILVA-MARTINS, S. *et al.* Myrtenol complexed with β -cyclodextrin ameliorates behavioural deficits and reduces oxidative stress in the reserpine-induced animal model of Parkinsonism. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 48, n. 11, p. 1488–1499, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13563>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- SINGH, Y.; MEHER, J. G.; RAVAL, K.; KHAN, F. A.; CHAURASIA, M.; JAIN, N. K.; CHOURASIA, M. K. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2017.03.008>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- SOMENSI, N. *et al.* Role of toll-like receptor 4 and sex in 6-hydroxydopamine-induced behavioral impairments and neurodegeneration in mice. **Neurochemistry International**, v. 151, p. 105215, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2021.105215>. Acesso em: 13 jul. 2025.

STANLEY BURNS, R.; MARKEY, S. P.; PHILLIPS, J. M.; CHIUEH, C. C. The neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the monkey and man. **The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques**, v. 11, n. 1 Suppl, p. 166–168, 1984. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0317167100046345>. Acesso em: 14 jul. 2025.

SUNG, H.-Y.; PARK, J.-W.; KIM, J.-S. The Frequency and Severity of Gastrointestinal Symptoms in Patients with Early Parkinson's Disease. **Journal of Movement Disorders**, v. 7, n. 1, p. 7–12, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.14802/JMD.14002>. Acesso em: 13 jul. 2025.

SUZUKI, K. *et al.* Impact of sleep-related symptoms on clinical motor subtypes and disability in Parkinson's disease: a multicentre cross-sectional study. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 88, n. 11, p. 953–959, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/JNNP-2017-316136>. Acesso em: 13 jul. 2025.

SWEENEY, M. D.; SAGARE, A. P.; ZLOKOVIC, B. V. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. **Nature reviews. Neurology**, v. 14, n. 3, p. 133–150, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/NRNEUROL.2017.188>. Acesso em: 13 jul. 2025.

TAGUCHI, T. *et al.* α -Synuclein BAC transgenic mice exhibit RBD-like behaviour and hyposmia: a prodromal Parkinson's disease model. **Brain**, v. 143, n. 1, p. 249–265, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWZ380>. Acesso em: 13 jul. 2025.

TANSEY, M. G.; WALLINGS, R. L.; HOUSER, M. C.; HERRICK, M. K.; KEATING, C. E.; JOERS, V. Inflammation and immune dysfunction in Parkinson disease. **Nature Reviews Immunology** 2022 22:11, v. 22, n. 11, p. 657–673, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00684-6>. Acesso em: 13 jul. 2025.

TELEANU, D. M.; CHIRCOV, C.; GRUMEZESCU, A. M.; VOLCEANOV, A.; TELEANU, R. I. **Blood-brain delivery methods using nanotechnology**. [S. l.]: MDPI AG, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040269>

TONG, J. The pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. **Theoretical and Natural Science**, v. 47, n. 1, p. 15–19, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.54254/2753-8818/47/2024PJ0101>. Acesso em: 13 jul. 2025.

TWELVES, D.; PERKINS, K. S. M.; COUNSELL, C. Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder**

Society, v. 18, n. 1, p. 19–31, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/MDS.10305>. Acesso em: 13 jul. 2025.

TYROSINE HYDROXYLASE INHIBITORS, Z.; RECEPTOR AGONISTS, D.; XIAO YI, L.; KING TAN, E.; DONG ZHOU, Z. Tyrosine Hydroxylase Inhibitors and Dopamine Receptor Agonists Combination Therapy for Parkinson's Disease. **International Journal of Molecular Sciences** 2024, Vol. 25, Page 4643, v. 25, n. 9, p. 4643, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/IJMS25094643>. Acesso em: 13 jul. 2025.

UNGERSTEDT, U. 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 107–110, 1968. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(68\)90164-7](https://doi.org/10.1016/0014-2999(68)90164-7). Acesso em: 14 jul. 2025.

VAKA, S. R. K.; SAMMETA, S. M.; DAY, L. B.; MURTHY, S. N. Delivery of Nerve Growth Factor to Brain Via Intranasal Administration and Enhancement of Brain Uptake. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 10, p. 3640–3646, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/JPS.21674>. Acesso em: 14 jul. 2025.

VALENTE, E. M. *et al.* Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. **Science (New York, N.Y.)**, v. 304, n. 5674, p. 1158–1160, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1096284>. Acesso em: 13 jul. 2025.

VAREŠLIJA, D.; TIPTON, K. F.; DAVEY, G. P.; MCDONALD, A. G. 6-Hydroxydopamine: a far from simple neurotoxin. **Journal of Neural Transmission** 2020 127:2, v. 127, n. 2, p. 213–230, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00702-019-02133-6>. Acesso em: 13 jul. 2025.

VO, Q.; GILMOUR, T. P.; VENKITESWARAN, K.; FANG, J.; SUBRAMANIAN, T. Polysomnographic Features of Sleep Disturbances and REM Sleep Behavior Disorder in the Unilateral 6-OHDA Lesioned Hemiparkinsonian Rat. **Parkinson's Disease**, v. 2014, n. 1, p. 852965, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/852965>. Acesso em: 13 jul. 2025.

VOLPICELLI-DALEY, L. A.; LUK, K. C.; PATEL, T. P.; TANIK, S. A.; RIDDLE, D. M.; STIEBER, A.; MEANEY, D. F.; TROJANOWSKI, J. Q.; LEE, V. M. Y. Exogenous α -Synuclein Fibrils Induce Lewy Body Pathology Leading to Synaptic Dysfunction and Neuron Death. **Neuron**, v. 72, n. 1, p. 57–71, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2011.08.033>. Acesso em: 14 jul. 2025.

VONG, L. B.; SATO, Y.; CHONPATHOMPIKUNLERT, P.; TANASAWET, S.; HUTAMEKALIN, P.; NAGASAKI, Y. Self-assembled polydopamine nanoparticles improve treatment in Parkinson's disease model mice and suppress dopamine-induced dyskinesia. **Acta**

Biomaterialia, v. 109, p. 220–228, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2020.03.021>. Acesso em: 13 jul. 2025.

WALLER, S.; WILLIAMS, L.; MORALES-BRICEÑO, H.; FUNG, V. S. **Focus | Clinical The initial diagnosis and management of Parkinson's disease** Reprinted from *AJGP*. [S. l.: s. n.].

WESTBROOK, A.; VAN DEN BOSCH, R.; MÄÄTTÄ, J. I.; HOFMANS, L.; PAPADOPETRAKI, D.; COOLS, R.; FRANK, M. J. Dopamine promotes cognitive effort by biasing the benefits versus costs of cognitive work. **Science (New York, N.Y.)**, v. 367, n. 6484, p. 1362–1366, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAZ5891>. Acesso em: 13 jul. 2025.

WILLIAMS-GRAY, C. H.; MASON, S. L.; EVANS, J. R.; FOLTYNIE, T.; BRAYNE, C.; ROBBINS, T. W.; BARKER, R. A. The CamPaIGN study of Parkinson's disease: 10-year outlook in an incident population-based cohort. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 84, n. 11, p. 1258–1264, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/JNNP-2013-305277>. Acesso em: 13 jul. 2025.

WOOTEN, G. F.; CURRIE, L. J.; BOVBJERG, V. E.; LEE, J. K.; PATRIE, J. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 75, n. 4, p. 637–639, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/JNNP.2003.020982>. Acesso em: 13 jul. 2025.

WU, X.; YUAN, R.; XU, Y.; WANG, K.; YUAN, H.; MENG, T.; HU, F. Functionalized lipid nanoparticles modulate the blood-brain barrier and eliminate α -synuclein to repair dopamine neurons. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 2, p. 100904, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.AJPS.2024.100904>. Acesso em: 13 jul. 2025.

XIE, C.; PRASAD, A. A. Probiotics Treatment Improves Hippocampal Dependent Cognition in a Rodent Model of Parkinson's Disease. **Microorganisms 2020, Vol. 8, Page 1661**, v. 8, n. 11, p. 1661, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8111661>. Acesso em: 13 jul. 2025.

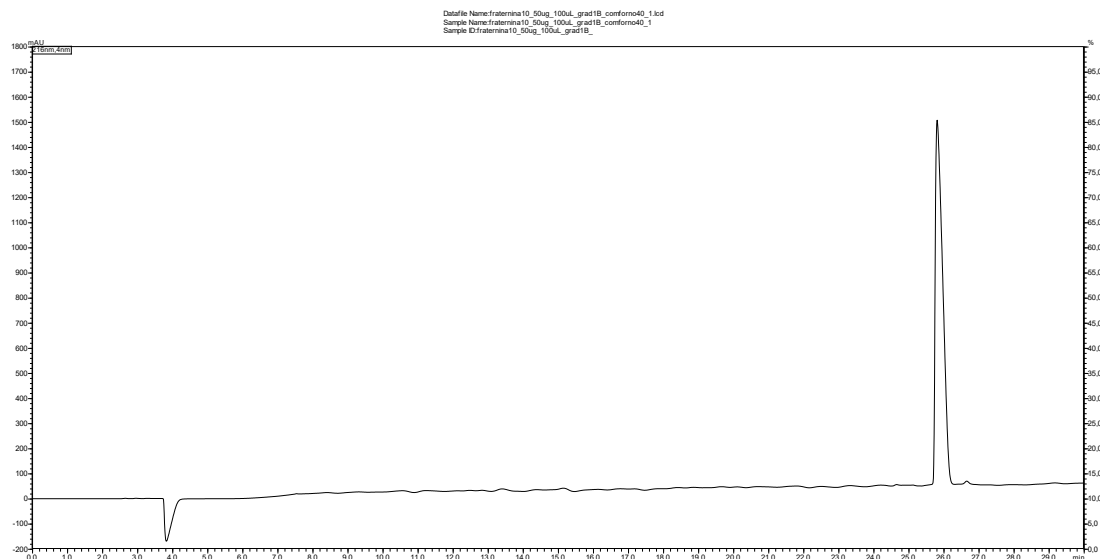
XIONG, Y. *et al.* Robust kinase- and age-dependent dopaminergic and norepinephrine neurodegeneration in LRRK2 G2019S transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 7, p. 1635–1640, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1073/PNAS.1712648115/SUPPL_FILE/PNAS.1712648115.ST01.DOCX. Acesso em: 13 jul. 2025.

- YADAV, V. K.; DHANASEKARAN, S.; CHOUDHARY, N.; NATHIYA, D.; THAKUR, V.; GUPTA, R.; PRAMANIK, S.; KUMAR, P.; GUPTA, N.; PATEL, A. **Recent advances in nanotechnology for Parkinson's disease: diagnosis, treatment, and future perspectives.** [S. l.]: Frontiers Media SA, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmed.2025.1535682>
- YANG, L.; ZHANG, X.; LI, S.; WANG, H.; ZHANG, X.; LIU, L.; XIE, A. Intranasal insulin ameliorates cognitive impairment in a rat model of Parkinson's disease through Akt/GSK3 β signaling pathway. **Life Sciences**, v. 259, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118159>
- YANG, X.; WANG, Y.; WU, C.; LING, E.-A. Animal Venom Peptides as a Treasure Trove for New Therapeutics Against Neurodegenerative Disorders. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 25, p. 4749–4774, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/0929867325666181031122438>
- YU, J.; MIN, D.; BAI, Y.; QU, L.; ZOU, T.; WANG, S. Electroacupuncture alleviates Parkinson disease and regulates the expression of brain-gut peptides. **Experimental Animals**, v. 69, n. 4, p. 448, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1538/EXPANIM.19-0153>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- YUSSOF, N. S.; PING, T. C.; BOON, T. T.; UTRA, U.; RAMLI, M. E. Influence of Soy Lecithin and Sodium Caseinate on The Stability and in vitro Bioaccessibility of Lycopene Nanodispersion. **Food Technology and Biotechnology**, v. 61, n. 1, p. 39, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.17113/FTB.61.01.23.7538>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- ZAHED, H.; ZUZUARREGUI, J. R. P.; GILRON, R.; DENISON, T.; STARR, P. A.; LITTLE, S. **The Neurophysiology of Sleep in Parkinson's Disease.** [S. l.]: John Wiley and Sons Inc, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds.28562>
- ZHANG, H.; GU, Z.; AN, J.; WANG, C.; CHAN, P. Non-motor symptoms in treated and untreated Chinese patients with early Parkinson's disease. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 232, n. 2, p. 129–136, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1620/TJEM.232.129>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- ZHANG, Q. Y.; WANG, Q.; FU, J. X.; XU, X. X.; GUO, D. S.; PAN, Y. C.; ZHANG, T.; WANG, H. Multi Targeted Therapy for Alzheimer's Disease by Guanidinium-Modified Calixarene and Cyclodextrin Co-Assembly Loaded with Insulin. **ACS Nano**, v. 18, n. 48, p. 33032–33041, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1021/ACSNANO.4C05693/SUPPL_FILE/NN4C05693_SI_001.PDF. Acesso em: 13 jul. 2025.

ZHOU, F.; PETERSON, T.; FAN, Z.; WANG, S. The Commonly Used Stabilizers for Phytochemical-Based Nanoparticles: Stabilization Effects, Mechanisms, and Applications. **Nutrients** **2023**, Vol. **15**, Page **3881**, v. 15, n. 18, p. 3881, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/NU15183881>. Acesso em: 13 jul. 2025.

ANEXOS

Anexo A. Perfil cromatográfico (RP-HPLC) da Fraternina-10



Anexo B. Aprovação comitê de ética


Universidade de Brasília
 Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 23 de novembro de 2020.

DECLARAÇÃO

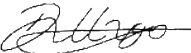
Declaramos que o projeto intitulado **"NOVOS FÁRMACOS NEUROPROTETORES PARA A DOENÇA DE PARKINSON: PEPTÍDEOS ISOLADOS DA PEÇONHA DE VESPAS SOCIAIS LIVRES E ASSOCIADOS À NANOFORMULAÇÕES"**, Protocolo n.º 032/2020 sob responsabilidade da Professora Márcia Renata Mortari, foi avaliado e aprovado pela Comissão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


 Dr. José Luiz Jivago de Paula Rôlo
 Coordenador da CEUA – UnB




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

Anexo C. Aprovação comitê de ética

		Universidade de Brasília
		Comissão de Ética no Uso Animal
		Brasília, 12 de agosto de 2024.
DECLARAÇÃO		
Declaramos que o projeto intitulado "Avaliação do efeito neuroprotetor e antiparkinsoniano de um peptídeo bioinspirado nanoencapsulado em um modelo de Doença de Parkinson em camundongos", SEI nº 23106.017341/2024-17, sob responsabilidade do(a) pesquisador(a) Márcia Renata Mortari, (mmortari@unb.br), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Esse projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília na 14ª reunião extraordinária, em 25/07/2024 para fins de PESQUISA e para utilização de Mus musculus (Swiss, 80 machos) provenientes do(a) Biotério do Laboratório de Neurofarmacologia da Universidade de Brasília. O presente certificado é válido pelo período de 12/08/2024 a 01/05/2029.		
	 Dr. Bruno Stéfano Lima Dallago Coordenador da CEUA – UnB	
*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.		