



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI – LIKA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

ANDRÉ LUCAS CORRÊA DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS
DO *ZEBRAFISH* EXPOSTO À ROTENONA COMO MODELO ANIMAL DA
DOENÇA DE PARKINSON-*LIKE* E DESENVOLVIMENTO DE ALTERNATIVA
NANOTECNOLÓGICA PARA TERAPÊUTICA**

RECIFE

2022

ANDRÉ LUCAS CORRÊA DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS
DO *ZEBRAFISH* EXPOSTO À ROTENONA COMO MODELO ANIMAL DA
DOENÇA DE PARKINSON-*LIKE* E DESENVOLVIMENTO DE ALTERNATIVA
NANOTECNOLÓGICA PARA TERAPÊUTICA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde pela Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof^o. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Andrade, André Lucas Corrêa

Avaliação dos parâmetros toxicológicos e comportamentais do *Zebrafish* exposto à Rotenona como modelo animal da doença de Parkinson-*Like* e desenvolvimento de alternativa nanotecnológica para terapêutica / André Lucas Corrêa Andrade. – 2022.

93 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2022.

Inclui referências e apêndices.

1. Doença de Parkinson. 2. Nanotecnologia. 3. Comportamento animal.
I. Cadena, Pabyton Gonçalves (orientador). I. Título.

616.833

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-222

ANDRÉ LUCAS CORRÊA DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS
DO *ZEBRAFISH* EXPOSTO À ROTENONA COMO MODELO ANIMAL DA
DOENÇA DE PARKINSON-*LIKE* E DESENVOLVIMENTO DE ALTERNATIVA
NANOTECNOLÓGICA PARA TERAPÊUTICA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde pela Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde.

Data de defesa: 04/08/2022

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena (Presidente)
Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto (1º Titular)
Universidade Federal de Pernambuco.

Prof. Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira (2º Titular)
Universidade Federal de Pernambuco.

Prof. Dra. Tatiana Souza Porto (3º Titular)
Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Prof. Ranilson de Souza Bezerra (4º Titular)
Universidade Federal de Pernambuco.

Dedico

À Deus, aos meus pais Mauro e Rosane e a minha
esposa Priscila, pelo suporte em todos os
momentos desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus por ter estado comigo e se fazer em Luz para guiar os caminhos da minha vida.

Eternamente serei grato aos meus pais Mauro e Rosane, por todo amor que me proporcionaram através dos ensinamentos, reclamações, incentivos e sermões, sobretudo pelo carinho, que foram e são partes importantes da minha formação.

Aos meus irmãos Igor e Arthur, que são tão importantes na minha vida, sendo às vezes mestres e outras vezes aprendizes, assim sempre cresceremos juntos.

A minha esposa Priscila, pelo constante carinho, dedicação, incentivo, paciência, ajuda e muita, em todas as fases deste trabalho. Especialmente pelo seu amor.

Ao Professor Pabyton, meu orientador sempre presente na minha formação acadêmica e sempre com disposição e vontade de me auxiliar nas várias etapas científicas.

A toda turma do LECA e especialmente a prof. Adélia, Amanda, Ivanildo, Jadson, Jué, Letícia, Marília, Prof. Marília, Matheus, Niely, Paulo, Renata, Renatta, Samara, Thamiris e Tiago.

A instituição Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal de Pernambuco pelas experiências e gerando momentos importantes para minha vida profissional e pessoal.

Ao CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

Aos participantes da banca examinadora.

E finalmente a todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram na superação de mais uma etapa da minha vida, eu agradeço!

"Na vida, não existe nada a temer, mas a entender."

Marie Curie

RESUMO

A indução de sintomas semelhantes aos da Doença de Parkinson (*DP-like*) em diferentes estágios de vida do *zebrafish* por exposição à rotenona foi analisada e o desenvolvimento de produtos tecnológicos para o tratamento da DP foi proposto. Para a avaliação dos parâmetros comportamentais e da atividade locomotora de *zebrafish* adultos expostos à rotenona, foi desenvolvido um dispositivo para captação de imagens com suportes para câmeras de vídeo. O desenvolvimento deste dispositivo resultou em uma patente de invenção, um desenho industrial e permitiu a realização dos testes comportamentais. Após previa aprovação pela CEUA-UFRPE, foram realizados testes em *zebrafish* adultos e em estágios iniciais. Com intuito de induzir sintomas *DP-like* em adultos de *zebrafish*, os peixes foram expostos a 2 e 5 µg/L de rotenona por 28 dias e sintomas motores e não motores *DP-like* foram avaliados. As concentrações utilizadas em *zebrafish* foram capazes de produzir efeitos negativos semelhantes aos sintomas motores da DP, porém não foram observadas alterações comportamentais como sintoma não motor da DP. *Zebrafish* em estágios iniciais de vida expostos a 5, 10, 15 e 20 µg/L de rotenona foram avaliados em parâmetros toxicológicos. Além disso, testes comportamentais foram realizados nas larvas com 144 horas pós-fertilização (hpf), para avaliar os sintomas não motores da DP, relacionados com ansiedade, resposta à estímulos físicos, acuidade visual e capacidade motora. Os resultados demonstraram o potencial de 10 e 15 µg/L de rotenona causar efeitos tóxicos avaliáveis e úteis nas triagens de fármacos, como atraso no desenvolvimento embrionário, defeitos teratogênicos, redução de tamanho e mortalidade. A rotenona também provocou mudança em padrões de ansiedade e ausência de resposta à estímulos físicos, que corrobora o *zebrafish* como um modelo animal *DP-like* adequado para estudos de triagem e terapêutica de novos fármacos para DP. Posteriormente, o potencial terapêutico da levodopa (LD) e do óleo essencial (OE) de *Piper nigrum* nos mesmos parâmetros toxicológicos e comportamentais de *zebrafish* *DP-like* expostos à concentração de rotenona determinada no teste anterior foi avaliado. Foi observado que o tratamento do *zebrafish* *DP-like* com LD resultou na proteção parcial contra a toxicidade da rotenona, enquanto o tratamento com OE forneceu proteção contra déficits motores e visuais. Como alternativa nanotecnológica para o tratamento da DP, foram propostas diferentes formulações de nanoemulsões óleo/água, contendo LD associada ao OE de *P. nigrum*. O desenvolvimento desta nanoemulsão resultou em uma patente de processo que produziu vesículas estáveis, compostas pelo OE, um surfactante, LD e tampão fosfato com pH neutro, de tamanho médio de $154,80 \pm 3,40$ nm, 0,322 de índice de polidispersão e potencial zeta de -33,8 mV. Diante dos resultados obtidos, consideramos que

o *zebrafish* exposto à rotenona é um modelo animal viável para realização de estudos de triagem e de terapêutica de novos fármacos para a DP. Adicionalmente, a utilização do OE de *P. nigrum* e sua formulação de nanoemulsão associada com LD pode ser uma alternativa para reduzir os sintomas da DP, porém ainda é necessário a realização de estudos adicionais para entender os efeitos da nanoemulsão em testes *in vivo*.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; Modelo animal; *Zebrafish*; Comportamento animal; Nanotecnologia.

ABSTRACT

The induction of symptoms similar to Parkinson's disease (PD-like) in different stages of zebrafish life by rotenone exposure was analyzed and the development of technological products for the treatment of PD was proposed. For the evaluation of behavioral parameters and locomotor activity of adult zebrafish exposed to rotenone, a device was developed to capture images with supports for video cameras. The development of this device resulted in an invention patent, an industrial design and allowed the conduct of behavioral tests. After previous approval by CEUA-UFRPE, tests were performed on adult and in early stages zebrafish. In order to induce PD-like symptoms in adults of zebrafish, fish were exposed to 2 and 5 $\mu\text{g/L}$ of rotenone for 28 days and motor and non-motor symptoms of PD-like were evaluated. The concentrations used in zebrafish were able to produce negative effects similar to the motor symptoms of PD, but no behavioral changes were observed as a non-motor symptom of PD. Zebrafish in early stages of life exposed to 5, 10, 15 and 20 $\mu\text{g/L}$ of rotenone were evaluated in toxicological parameters. In addition, behavioral tests were performed on larvae with 144 hours post-fertilization (hpf), to evaluate the non-motor symptoms of PD, related to anxiety, response to physical stimuli, visual acuity and motor capacity. The results demonstrated the potential of 10 and 15 $\mu\text{g/L}$ of rotenone to cause evaluable and useful toxic effects in drug screening, such as delay in embryonic development, teratogenic defects, size reduction and mortality. Rotenone also caused changes in anxiety patterns and absence of response to physical stimuli, which corroborates zebrafish as a suitable PD-like animal model for screening and therapeutic studies of new drugs for PD. Subsequently, the therapeutic potential of levodopa (LD) and *Piper nigrum* essential oil (EO) in the same toxicological and behavioral parameters of zebrafish PD-like exposed to rotenone concentration determined in the previous test was evaluated. It was observed that the treatment of zebrafish PD-like with LD resulted in partial protection against rotenone toxicity, while the treatment with OE provided protection against motor and visual deficits. As a nanotechnological alternative for the treatment of PD, different formulations of oil/water nanoemulsions containing LD associated with *P. nigrum* EO were proposed. The development of this nanoemulsion resulted in a process patent that produced stable vesicles, composed by EO, a surfactant, LD and phosphate buffer with neutral pH, average size of 154.80 \pm 3.40 nm, 0.322 polydispersity index and zeta potential of -33.8 mV. Given the results obtained, we consider that the zebrafish exposed to rotenone is a viable animal model for conducting screening studies and therapy of new drugs for PD. Additionally, the use of *P. nigrum* EO and its formulation of nanoemulsion

associated with LD may be an alternative to reduce the symptoms of PD, but further studies are still necessary to understand the effects of nanoemulsion *in vivo* tests.

Keywords: Parkinson's Disease; Animal model; Zebrafish; Animal behavior; Nanotechnology.

LISTA DE FIGURAS

2 REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – *Danio rerio* adulto criado no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal – LECA – UFRPE..... 38
- Figura 2** – Larva de *Danio rerio* com 144 horas pós-fertilização criado no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal – LECA – UFRPE..... 39
- Figura 3** – Número de artigos publicados encontrados na base de dados Scopus relacionados com Doença de Parkinson e *zebrafish* durante 2012 – 2021 42
- Figura 4** – Número de artigos publicados encontrados na base de dados Scopus relacionados com Doença de Parkinson, *zebrafish* e rotenona durante 2014 – 2022..... 45

4 RESULTADO

- Figura 1** – Taxa de epibolia de embriões de zebrafish expostos a rotenona entre 2 e 8 hpf. A taxa de epibolia foi considerada afetada quando $* = p < 0,05$. Cada grupo rotenona foi comparado com o grupo DMSO por one-way ANOVA ($F(4,141) = 23,904$ $p < 0,05$) seguido pelo teste de Tukey (ROT5 $p = 0,985$, ROT10 $p < 0,001$, ROT15 $p < 0,001$, ROT20 $p < 0,001$). Legenda dos grupos experimentais: DMSO – 0,1% (v/v) Dimetilsulfóxido; ROT5, ROT10, ROT15, e ROT20 – 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/L}$ de rotenona, respectivamente.58
- Figura 2** – Os zebrafish foram expostos à rotenona em 2 hpf e a mortalidade foi registrada entre 24 e 144 hpf após a exposição. Grupos experimentais: DMSO – 0,1% (v/v) Dimetilsulfóxido; ROT5, ROT10, ROT15 e ROT20 – 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/L}$ de rotenona, respectivamente..... 59
- Figura 3** – Percentual de animais afetados (animais com efeitos teratogênicos + animais mortos) entre 24 e 96 hpf após exposição embrionária à rotenona. Aumentos significativos na porcentagem de animais afetados foram considerados quando $* = p < 0,05$. Os grupos experimentais em (a) 24 hpf foram comparados ao grupo DMSO por one-way ANOVA ($F(4,29) = 7,867$ $p < 0,05$) seguido pelo teste de Tukey (ROT5 $p = 0,999$, ROT10 $p = 0,026$, ROT15 $p = 0,002$, ROT20 $p = 0,012$). Os grupos experimentais em (b) 48 hpf foram comparados ao grupo DMSO por one-way ANOVA ($F(4,29) = 5,378$ $p < 0,05$) seguido pelo teste de

Tukey (ROT5 $p = 0,905$, ROT10 $p = 0,469$, ROT15 $p = 0,004$, ROT20 $p = 0,023$). Os grupos experimentais em (c) 72 hpf foram comparados ao grupo DMSO por one-way ANOVA ($F(4,29) = 84,226$ $p < 0,05$) seguido pelo teste de Tukey (ROT5 $p = 0,684$, ROT10 $p < 0,001$, ROT15 $p < 0,001$, ROT20 $p < 0,001$). Os grupos experimentais em (d) 96 hpf foram comparados ao grupo DMSO por one-way ANOVA ($F(4,29) = 32,095$ $p < 0,05$) seguido pelo teste de Tukey (ROT5 $p = 0,996$, ROT10 $p = 0,007$, ROT15 $p < 0,001$, ROT20 $p < 0,001$). Legenda: DMSO – 0,1% (v/v) Dimetilsulfóxido; ROT5, ROT10, ROT15 e ROT20 – 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/L}$ de rotenona, respectivamente. 61

Figura 4 – Larvas de zebrafish expostas a altas concentrações de rotenona mostraram reduções na exibição de tigmotaxia e na sensibilidade ao toque. (a) O teste de tigmotaxia avalia comportamentos de ansiedade em larvas de zebrafish. A porcentagem da resposta de cada grupo foi comparada com o grupo DMSO por one-way ANOVA ($F(4,34) = 6,165$ $p < 0,05$) seguido pelo teste de Tukey (ROT5 $p = 0,669$, ROT10 $p = 0,261$, ROT15 $p = 0,013$, ROT20 $p = 0,001$); (b) O teste de sensibilidade ao toque avalia a resposta larval à estímulos mecânicos. A porcentagem da resposta de cada grupo foi comparada com o grupo DMSO por one-way ANOVA ($F(4,12) = 4,366$ $p < 0,05$) seguido pelo teste de Tukey (ROT5 $p = 0,633$, ROT10 $p = 0,414$, ROT15 $p = 0,991$, ROT20 $p = 0,009$). Legenda: DMSO – 0,1% (v/v) Dimetilsulfóxido; ROT5, ROT10, ROT15 e ROT20 – 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/L}$ de rotenona, respectivamente. (c) A resposta optomotora de zebrafish como porcentagens total e comparada pelo teste de simetria de McNemar no mesmo grupo entre a posição inicial (PI) e posição final (PF) * = $p < 0,05$. Posição inicial contra a posição final: DMSO $p < 0,001$; ROT5 $p < 0,001$; ROT10 $p < 0,001$; ROT15 $p < 0,001$; ROT20 $p < 0,001$). 67

LISTA DE TABELAS

2 REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 – Propriedades Físico-Químicas da levodopa..... 26

Tabela 2 – Propriedades Físico-Químicas da rotenona 43

4 RESULTADO

Tabela 1 – Medidas morfométricas de larvas de zebrafish expostas à rotenona em 144 hpf.
..... 62

Tabela 2 – Resumo dos efeitos observados causados por diferentes concentrações de rotenona nos parâmetros avaliados no modelo de zebrafish *DP-like*. 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DP	Doença de Parkinson
DA	Doença de Alzheimer
GBD	Do inglês, Global Burden of Disease, Injuries, and Risk Factors Study
MDS	Do inglês, International Parkinson and Movement Disorder Society
LD	Levodopa
MAO-B	Monoamina oxidase B
EPC	Estimulação cerebral profunda
FDA	Food and Drug Administration
EROs	Espécies reativas de oxigênio
DDC	Dopa-descarboxilas
O/A	Óleo em água
A/O	Água em óleo
GRAS	Do inglês, Generally Recognized as Safe
PIE	Ponto de inversão da emulsão
TIF	Temperatura de inversão de fase
HAP	Homogeneização de alta pressão
NE	Nanoemulsões
PDI	Índice de polidispersão
OE	Óleos essenciais
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridna
6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
MPP+	1-metil-4 fenilpiridínio
hpf	Horas pós fertilização
CG-EM	Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa
DP-like	Doença de Parkinson-Like
EHL	Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
FCR	Força Centrífuga Relativa
PBS	Tampão fosfato salino
PC	Espectroscopia de correlação de fótons padrão
CE ₅₀	metade da concentração efetiva máxima
CL ₅₀	metade da concentração letal máxima
PFA	paraformaldeído

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	DOENÇA DE PARKINSON	20
2.1.1	Prevalência e custos da Doença de Parkinson.....	22
2.1.2	Tratamentos da Doença de Parkinson.....	24
2.1.2.1	Levodopa como tratamento da Doença de Parkinson.....	25
2.2	NANOEMULSÕES.....	28
2.2.1	Vantagens e Desvantagens das Nanoemulsões como Sistemas de Liberação de Controlada.....	30
2.2.2	Uso de Nanoemulsão para Tratamento da DP.....	31
2.3	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	33
2.3.1	Utilização de Óleos essenciais no tratamento da DP	34
2.3.2	Pimenta negra (<i>Piper nigrum</i>)	35
2.4	MODELOS ANIMAIS NO ESTUDO DE DOENÇAS	36
2.4.1	Uso de <i>Danio rerio</i> (Hamilton, 1822) como Modelo Animal	37
2.4.2	Utilização da espécie <i>Danio rerio</i> para estudos sobre DP	40
2.4.3	Utilização da rotenona para indução de sintomas DP-like	42
2.4.4	Outras neurotoxinas utilizadas para indução de sintomas DP-like	46
3	OBJETIVOS	48
3.1	OBJETIVO GERAL.....	48
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4	RESULTADO	49
	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DOS SINTOMAS NÃO MOTORES PARKINSON-LIKE INDUZIDOS POR ROTENONA EM ZEBRAFISH COMO MODELO ANIMAL	49
5	CONCLUSÕES.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71
	APÊNDICE A – PATENTE DE INVENÇÃO BR 10 2019 009007-3 A2: “DISPOSITIVO TIPO TORRE PARA CAPTAÇÃO DE IMAGENS PARA OBTENÇÃO DE DADOS COMPORTAMENTAIS DE ANIMAIS AQUÁTICOS EM VIVEIRO”	82

APÊNDICE B – DESENHO INDUSTRIAL BR 30 2020 002588-1: “CONFIGURAÇÃO APLICADA A DISPOSITIVO TIPO TORRE PARA CAPTAÇÃO DE IMAGENS”	84
APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO: "EFEITOS MOTORES DA ROTENONA EM <i>ZEBRAFISH</i> COMO MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON- <i>LIKE</i> "	86
APÊNDICE D – APRESENTAÇÃO ORAL: "EFEITOS MOTORES DA ROTENONA EM <i>ZEBRAFISH</i> COMO MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON- <i>LIKE</i> "	87
APÊNDICE E – RESUMO PUBLICADO NO 56º CONGRESSO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FISILOGIA: “EVALUATION OF THE TOXIC EFFECTS OF ROTENONE ON EARLY STAGES OF <i>DANIO RERIO</i> BY BEHAVIORAL AND MOTOR TESTS”	88
APÊNDICE F – PATENTE DE INVENÇÃO BR 10 2020 024914 2: “PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTENDO LEVODOPA ENCAPSULADA”	90
APÊNDICE G – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS PROTOCOLO NÚMERO 114/2018	92
APÊNDICE H – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS PROTOCOLO NÚMERO 3581030221	93

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) é o segundo distúrbio neurodegenerativo mais comum após a Doença de Alzheimer e possui prevalência de aproximadamente 1% na população acima dos 60 anos e 4% acima dos 85 anos (DENG; WANG; JANKOVIC, 2017). No entanto, a DP é a doença neurodegenerativa progressiva com crescimento mais rápido em prevalência e número de incapacitados, tornando-se uma das principais causas de incapacidade no mundo (DORSEY, 2018). Esta doença se caracteriza por ser um distúrbio neurodegenerativo progressivo com sintomas motores, como tremores, rigidez e instabilidade postural (DICKSON, 2018). Apesar dos sintomas motores serem mais aparentes e fáceis de identificar, a DP possui uma gama de sintomas não-motores, como perda de olfato, distúrbios do sono, alterações de personalidade, depressão, desordens neuropsiquiátricas, dificuldade de fala e deglutição (SANTOS et al., 2022).

Além dos fatores acima citados, a DP é considerada uma doença complexa pois a etiologia exata e os mecanismos patogênicos ainda não são totalmente compreendidos e provavelmente são multifatoriais (WRANGEL et al., 2015; GEORGIU et al., 2019). Dentre os principais fatores de risco relacionados com a DP estão os ambientais, como exposição a neurotoxinas, traumatismos cranianos e idade, e os fatores genéticos (GEORGIU et al., 2019). Adicionalmente, evidências sustentam que o estresse oxidativo e a deficiência do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial desempenha um papel central na patogenia da DP (WRANGEL et al., 2015). Todavia, é estabelecido que a DP envolve a perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância nigra e a acumulação de α -sinucleína nos corpos de Lewy, ocasionando desnervação nas vias neurotransmissoras responsáveis pelos principais defeitos motores (ZESIEWICZ, 2019).

Em razão da morte dos neurônios dopaminérgicos e a consequente redução dos níveis de dopamina, um precursor de dopamina conhecido como levodopa (LD) é a principal estratégia farmacológica e considerada padrão ouro no tratamento da DP (ARMSTRONG; OKUN, 2020). A LD é um fármaco que atua primariamente na reposição de dopamina para a melhora dos sintomas motores da doença, porém a LD não reduz a progressão da doença e não trata diretamente os sintomas não motores (ARMSTRONG; OKUN, 2020; VÁZQUEZ-VÉLEZ; ZOGHBI, 2021). Em contrapartida, mesmo sendo considerado padrão ouro, o tratamento com LD pode provocar vários efeitos colaterais neurológicos, na qual muitos pacientes que respondem ao medicamento também desenvolvem flutuações motoras e discinesias (LEE; YANKEE, 2021). Adicionalmente, dentre os principais desafios

farmacológicos enfrentados em relação à LD estão sua distribuição descontínua no organismo, meia-vida curta, baixa biodisponibilidade e janela terapêutica estreita (TAMBASCO; ROMOLI; CALABRESI, 2018).

Diante dos desafios já citados do tratamento com a LD, é necessário a realização de estudos em busca de alternativas para melhorar os tratamentos disponíveis ou o desenvolvimento de novos tratamentos. Uma alternativa para auxiliar as características da LD e de outros fármacos é a utilização de sistemas de nanoemulsão, pois possuem o potencial carreador para a entrega eficiente através da barreira hematoencefálica (ZAINOL et al., 2012). As nanoemulsões são capazes de aumentar a permeabilidade ou biodisponibilidade de fármacos com baixa biodisponibilidade através da pele e membrana gastrointestinal (HARWANSH et al., 2019). Outras vantagens atribuídas a esses sistemas estão a biocompatibilidade e a biodegradabilidade, serem fisicamente estáveis e relativamente fáceis para produção em larga escala utilizando tecnologia comprovada (LI et al., 2008).

Outra abordagem que tem sido utilizada consiste na utilização dos fármacos da medicina convencional associados à produtos naturais oriundos de plantas, conhecidos como fitoterápicos, para prevenção e tratamento da DP (MYTHRI et al., 2012). Os fitoterápicos possuem uma ampla variedade de moléculas fitoquímicas, como flavonoides, taninos e terpenóides que revelaram benefícios protetores e terapêuticos em diferentes enfermidades, como as doenças neuropsicológicas (SHAHPIRI et al., 2016). Um dos compostos que se destaca entre os fitoterápicos são os óleos essenciais (OEs), líquidos voláteis presentes em diferentes partes das plantas (BUKOLA et al., 2020). Em estudos prévios, os OEs se destacaram por possuir várias propriedades biológicas incluindo atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, anticâncer e antidiabéticas (LI et al., 2012; FORRESTER et al., 2014; RASHED et al., 2021). Na pesquisa de Shrivastava et al., (2013), foi utilizado fitoquímicos de *Piper nigrum* (pimenta negra), uma das especiarias mais populares utilizadas no mundo pertencente à família Piperaceae, para o tratamento de ratos como modelo animal de sintomas semelhantes à DP (*DP-like*) induzidos pela neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA). Nesta pesquisa foi demonstrado propriedades antioxidantes, anti-apoptóticas e anti-inflamatórias dos fitoquímicos de *P. nigrum* que melhoraram a capacidade de aprendizagem cognitiva dos ratos tratados em comparação aos não tratados (SHRIVASTAVA et al., 2013).

A descoberta de novos tratamentos para uma doença complexa como o Parkinson necessita da realização de estudos pré-clínicos em modelos animais para responder questões cruciais sobre a eficácia e segurança dos novos tratamentos (LARIJANI et al., 2019). Um modelo animal que se mostra adequado para esse tipo de pesquisa é o peixe *Danio rerio*

(mundialmente conhecido como *zebrafish*) pois apresenta diversas vantagens como modelo animal e é bastante utilizado como modelo de doenças neurológicas e testes farmacológicos (BASNET et al., 2019). *Zebrafish* são peixes teleósteos de água doce com pequeno porte (3 a 4 cm de comprimento) pertencentes à família Cyprinidae oriundos do Sul da Ásia, possuindo preferência pela região tropical (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012). As principais vantagens do *zebrafish* são: pequeno tamanho na fase larval e adulta, embriões transparentes, baixos custos para sua manutenção, fertilização externa e rápida, capacidade reprodutiva robusta e alta possibilidade de testes com métodos quantitativos em larga escala (DOYLE; CROLL, 2022). Esse peixe se destaca como modelo animal pelo genoma altamente conservado com os dos humanos, sendo cerca de 76 até 82% dos genes de doenças humanas também presentes no *zebrafish* (ÇALIŞKAN; EMEKLI-ALTURFAN, 2021).

A utilização do *zebrafish* como modelo animal respeita o princípio bioético dos "3 Rs", pois podem substituir (*Replacement*) animais de maiores níveis taxonômicos, como os mamíferos, promover a redução (*Reduction*) no uso de mamíferos nas primeiras fases de testes de substâncias candidatas para tratamento farmacológico e refinar (*Refinement*) da administração das substâncias que serão testadas por imersão no ambiente aquoso, reduzindo o uso de procedimentos invasivos (CASSAR et al., 2020). Para que o *zebrafish* se torne um modelo animal que apresente mecanismos e sintomas semelhantes ao da DP utiliza-se substâncias neurotóxicas indutoras como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridna (MPTP), a 6-OHDA, o paraquat e a rotenona (KALYN M, et al., 2020). Dentre essas substâncias a rotenona, um pesticida utilizado na aquicultura, foi escolhida por agir na inibição funcional do complexo mitocondrial I, criando estresse oxidativo que resulta na perda de neurônios dopaminérgicos (WATABE; NAKAKI, 2007). No entanto, mesmo a rotenona já tendo sido utilizada em estudos para indução do *zebrafish* DP-like, a sua natureza tóxica em peixes dificulta na determinação de uma concentração ótima para reduzir os neurônios dopaminérgicos, provocar sintomas e ao mesmo tempo causar baixa mortalidade (KALYN et al., 2020). Além disso, ainda há necessidade do entendimento dos variados sintomas da DP, principalmente os não-motores, que foram pouco estudados em *zebrafish* em diferentes estágios de vida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA DE PARKINSON

Inicialmente a Doença de Parkinson (DP) foi descrita no ano de 1817 como "shaking palsy" por James Parkinson e aproximadamente 50 anos depois o neurologista Jean Martin Charcot reconheceu o significado da descoberta de Parkinson e renomeou o transtorno como "maladie de Parkinson" ("Mal de Parkinson"), de acordo com Obeso et al. (2017). Essa doença é um distúrbio neurodegenerativo progressivo caracterizado por bradicinesia, tremor, rigidez e instabilidade de postura (WHO, 2006; DICKSON, 2018). No entanto, atualmente essa doença não é mais considerada um transtorno puramente de movimento, mas uma desordem multissistêmica e multi-sintomática (OERTEL; SCHULZ, 2016). Portanto, além dos sintomas motores da DP, há outros sintomas não motores como a hiposmia, desordens no sono, alterações de personalidade, dor, depressão e em portadores com a doença em estágios mais avançados ocorrem distúrbios neuropsiquiátricos, instabilidade postural e quedas, congelamento da marcha, dificuldade de fala e deglutição (SANTOS et al., 2022).

A fisiopatologia da DP envolve a perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância nigra e a acumulação de α -sinucleína nos corpos de Lewy, ocasionando desnervação nas vias neurotransmissoras responsáveis pelos principais defeitos motores (ZESIEWICZ, 2019). Os sintomas da DP não se desenvolvem até que cerca de 50-60% dos neurônios da substância nigra sejam perdidos e cerca de 80-85% do conteúdo de dopamina do corpo estriado esteja esgotado (WIRDERFELDT et al., 2011). No entanto, a etiologia exata da DP continua desconhecida e é provavelmente multifatorial, mas evidências experimentais sustentam o conceito de que o estresse oxidativo e a deficiência do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial desempenha um papel central na patogênese (WRANGEL et al., 2015).

A DP é provavelmente causada por vários fatores que levam a deterioração dos neurônios dopaminérgicos, sendo estimado que 5% até 10% dos pacientes possuem causas genéticas para a doença (ZESIEWICZ, 2019). Outras causas apontadas que podem ser associadas com a DP são fatores ambientais, como ferimentos na cabeça, e exposição a substâncias tóxicas, incluindo pesticidas (como rotenona e paraquat), metais pesados (como manganês, chumbo e cobre) e outras substâncias (como bifenilos policlorados, tricloroetileno, percloroetileno e tetracloreto de carbono) (ZESIEWICZ, 2019).

Segundo Postuma et al. (2015), provavelmente existe um período pré-sintomático de vários anos ou décadas, em que alterações neuropatológicas e uma redução de dopamina já esteja presente sem a manifestação de sintomas clínicos. Estudos extensivos em cérebros humanos normais e doentes mostraram que as inclusões de α -sinucleína emergem numa ordem previsível em diferentes partes do cérebro, tornando possível distinguir seis fases do acúmulo da α -sinucleína e isso relaciona-se com a progressão da sintomatologia da doença, de acordo com Braak e Del Tredici (2009). Nos estágios iniciais (I e II), as inclusões de α -sinucleína geralmente ocorrem nos neurónios colinérgicos e monoaminérgicos do tronco encefálico inferior, no núcleo motor dorsal vago e nervos glossofaríngeo ou no bulbo olfativo, sendo casos ainda assintomáticos. Os estágios III e IV são representados por infiltrações semelhantes nos neurónios do mesencéfalo, prosencéfalo basal e a *substantia nigra* começa, mesmo subclínicamente, a ser afetada, assim como o início dos sintomas motores da DP. Nos últimos estágios (V e VI), os corpos de Lewy são encontrados nas regiões do cérebro límbico e neocórtex com progressão da doença, provavelmente causando muitos dos sintomas cognitivos associados à DP avançada (OERTEL; SCHULZ, 2016; POEWE et al., 2017).

Adicionalmente, o diagnóstico preciso e a detecção precoce da DP têm o potencial de ser um benefício crucial para o tratamento clínico dos pacientes e para o estudo de abordagens terapêuticas (NALLS et al., 2015). Dessa forma, como forma de evitar que haja falsos positivos ou diagnósticos equivocados da DP, a Sociedade Internacional de Parkinson e Distúrbios no Movimento (MDS, do inglês: *International Parkinson and Movement Disorder Society*), apresenta critérios de diagnóstico para a DP (POSTUMA et al., 2015). Os critérios são divididos em dois passos, o primeiro avalia o diagnóstico de parkinsonismo (principal característica) pela presença de bradicinesia como lentidão de movimento e decréscimo na amplitude ou velocidade à medida que os movimentos são continuados, em combinação com pelo menos um entre rigidez e/ou tremor de repouso (POSTUMA et al., 2015). O segundo passo é determinar a DP como causa do parkinsonismo com dois níveis de certeza diagnóstica, para que essa certeza seja estabelecida é necessário preencher todos os três seguintes parâmetros: 1. ausência de critérios absolutos de exclusão, que incluem evidências clínicas ou de imagem para diagnósticos alternativos de parkinsonismo, como parkinsonismo atípico, parkinsonismo induzido por drogas ou tremor essencial; 2. dois ou mais dos seguintes critérios: a responsividade à levodopa, presença de tremor de repouso clássico, a presença de discinesias induzidas por levodopa, ou presença de perda olfatória; 3. ausência de fortes sinais, no qual refere-se a características que são incomuns, mas não absolutamente excludentes para a DP, por exemplo, a rápida progressão do comprometimento da marcha que

requer o uso de cadeiras de rodas ou o desenvolvimento de insuficiência autonômica severa dentro de 5 anos após o início (POSTUMA et al., 2015).

Embora o diagnóstico da DP seja possível, entre 75% e 95% dos pacientes diagnosticados com DP por especialistas têm seu diagnóstico confirmado em autópsia (POSTUMA et al., 2015). Assim como o diagnóstico, o tratamento para DP é bastante complexo e permanece apenas sintomático, pois ainda não há tratamento efetivo ou medicamento que possa interromper ou retardar o processo de neurodegeneração da DP até o momento (OERTEL; SCHULZ, 2016; GAO et al., 2019). Atualmente o tratamento para a DP inclui farmacoterapia, neurocirurgia estereotáxica funcional e terapia de suporte, como exemplo a fisioterapia, terapia da fala e medidas dietéticas (OERTEL; SCHULZ 2016). Os sintomas motores podem ser reduzidos pela utilização de drogas que aumentam o nível de dopamina no sistema nervoso central ou mimetizam os seus efeitos (BASSANI; VITAL; RAUH, 2015).

2.1.1 Prevalência e custos da Doença de Parkinson

Os distúrbios neurológicos contribuem aproximadamente para 11% da carga global de doenças e é previsto um incremento desse número nos próximos anos devido ao envelhecimento da população global (KARAMI et al., 2019). Entre esses distúrbios neurodegenerativos a Doença de Parkinson (DP) é a segunda mais comum após a Doença de Alzheimer (DA), sendo que a prevalência da DP é de aproximadamente 1% dos indivíduos acima dos 60 anos e 4% da população acima dos 85 anos (DENG; WANG; JANKOVIC, 2017). Paralelamente, de acordo com os dados examinados por Dorsey et al. (2018) no último Estudo Global de Doença, Lesões e Fatores de Risco (GBD, do inglês: *Global Burden of Disease, Injuries, and Risk Factors Study*) em 2016, a doença de Parkinson foi o distúrbio neurológico que mais cresceu em prevalência, incapacidade e óbitos. Nesse mesmo estudo, estimou-se que o número total de pessoas afetadas pela DP tenha mais que dobrado globalmente entre 1990 e 2016.

No ano de 2016 o número de pessoas com DP foi de 6,1 milhões no mundo todo, desse número 2,9 milhões (47,5%) eram mulheres e 3,2 milhões (52,5%) foram homens. De acordo com Rocca (2018), o padrão dimórfico da DP pode fornecer um ponto relevante para o entendimento dos fatores de riscos ambientais e sociais. Pois a frequência de exposição a alguns fatores de risco é diferente entre homens e mulheres (SAVICA et al., 2013), como tabagismo, traumatismo craniano e uso de pesticidas, ainda, é possível que esses fatores de

risco exerçam interações diferentes de devido variáveis sexuais (por exemplo, efeitos de hormônios sexuais) ou variáveis de gênero (como educação ou ocupações diferentes).

No entanto, o aumento no número de pacientes com DP em todo mundo entre 1990 e 2016 não é explicado exclusivamente por um aumento no número de pessoas mais velhas (Dorsey et al., 2018). As taxas globais de prevalência padronizadas por idade aumentaram em 21,7% de 1990 a 2016 (de 18,1% para 25,3%, respectivamente) em comparação com um aumento de 74,3% para a taxa de prevalência bruta (de 69,2% para 79,6%, respectivamente) (Dorsey et al., 2018). Segundo o GBD, em 2016 no Brasil foram contadas aproximadamente 4.033 mortes causadas pela DP, com um aumento percentual de 15% entre 1990 e 2016 (de 11,1% para 19,6%). Em relação ao número da prevalência o número foi 128.836 representando um aumento de 16,4% (de 14,2% em 1990 para 18,7% em 2016). Em um estudo realizado por Dorsey et al. (2007), a previsão do número de pessoas com a DP para o ano de 2030 será de aproximadamente 9 milhões em todo mundo, representando um aumento de cerca de 48% em relação aos dados de 2016.

Em relação aos custos da DP, uma pesquisa realizada em 28 países europeus classificou a DP como a quarta doença mais dispendiosa dentre os 12 distúrbios neurológicos mais prevalentes e custosos (GUSTAVSSON et al., 2010). O custo anual da DP está diretamente correlacionado com a gravidade da doença, de modo que os custos aumentam com a progressão da DP nas idades mais avançadas (DOWDING; SHENTON; SALEK, 2006). O primeiro estudo realizado no Brasil com objetivo de avaliar os custos associados à DP foi realizado por Bovolenta et al. (2017), no qual foi mensurado que a média anual do custo da DP por paciente em São Paulo é de US\$ 5,853.50, sendo US\$3.076,84 em custos diretos, como compra de medicamentos e terapias, e o restante em custos indiretos. Nos Estados Unidos, com uma prevalência de 630.000 casos de DP o custo calculado foi de aproximadamente de US\$ 22,800 por paciente e a carga econômica da DP ultrapassou US\$ 14,4 bilhões para este país em 2010 (KOWAL et al., 2013). Já em 2017, a prevalência mensurada nos Estados Unidos aumentou para 1.040.000 indivíduos com DP diagnosticada, gerando um salto na carga econômica total para US\$ 51,8 bilhões (YANG et al., 2020). No Japão, de acordo com Yoritaka et al., (2016), o maior custo no tratamento clínico da DP são os fármacos, que representam mais que 90% dos custos diretos. De acordo com Yang e Chen (2017), o custo anual médio por paciente com DP na China foi de US\$ 3,255.94, sendo 24,19% do total gasto com medicamentos antiparkinsonianos, principalmente levodopa e agonistas dopaminérgicos.

2.1.2 Tratamentos da Doença de Parkinson

As opções de tratamento para DP devem ser direcionadas tanto para os sintomas motores, quanto para os não-motores, podendo diferir dependentemente da severidade e duração da doença (ZESIEWICZ, 2019). A principal estratégia farmacológica para o tratamento da DP consiste primariamente na reposição de dopamina para a melhora dos sintomas da doença (ARMSTRONG; OKUN, 2020). A levodopa (LD), agonistas de dopamina e inibidores de monoamina oxidase-B (MAO-B) são úteis para a reposição dos níveis dopaminérgicos na terapia inicial da doença (ARMSTRONG; OKUN, 2020).

A LD é o padrão ouro para o tratamento de DP e a droga mais eficaz para sintomas motores (BALESTRINO; SCHAPIRA, 2019) (mais detalhes no tópico 2.1.2.1.). Os agonistas da dopamina, que podem ser indicados como monoterapia nas fases iniciais da DP, pois estimulam diretamente os receptores de dopamina pós-sinápticos no corpo estriado e estão associados com menor risco para discinesia, mas não são tão efetivos quanto a LD na reversão de sintomas motores (BALESTRINO; SCHAPIRA, 2019). Já o potencial terapêutico dos inibidores MAO-B está na habilidade de diminuição do metabolismo da dopamina, capaz de prolongar e potencializar a estimulação dopaminérgica, quando utilizado como tratamento inicial pode atrasar a deterioração motora e a necessidade por terapia dopaminérgica adicional (POEWE et al., 2017).

Entre os tratamentos farmacológicos por via dopaminérgica, a LD alcança um melhor controle dos sintomas motores da DP, porém após seu uso em longa duração ou em altas doses o paciente pode desenvolver discinesias e flutuações motoras (RIZEK et al., 2016). À medida que o tratamento da DP se estende, os portadores geralmente necessitam de uma frequência maior de LD e com maiores doses, pois os pacientes perdem a resposta ao longo prazo para medicações dopaminérgica (ARMSTRONG; OKUN, 2020). Uma das formas de reduzir os efeitos colaterais do tratamento por PD é utilizando forma de liberação prolongada da LD, adicionando um inibidor MAO-B ou pela adição de um agonista de dopamina para prover uma resposta mais estável (ZESIEWICZ, 2019). No entanto, ainda não existem tratamentos que mudem o rumo da DP e consigam reverter a doença (BALESTRINO; SCHAPIRA, 2019).

Neste sentido, pesquisas estão sendo realizadas para utilização de terapias com medicamentos não-dopaminérgicos, com intuito de melhorar a sintomatologia motora da DP sem causar potenciais efeitos colaterais oriundos do tratamento com reposição dopaminérgica (FREITAS; FOX, 2016; GONZALEZ-LATAPI et al., 2020). A maior parte do sucesso da

terapia não-dopaminérgica está sendo direcionada a redução de flutuações motoras e discinesia, porém em monoterapia dos sintomas motores não houve novos fármacos não-dopaminérgicos bem-sucedidos (GONZALEZ-LATAPI et al., 2020).

Além das estratégias farmacológicas, existem três tratamentos cirúrgicos mais utilizados para a DP, que são a cirurgia ablativa, estimulação cerebral profunda (EPC) e enxerto de células mesencefálicas fetais (LEE; YANKEE, 2021). Dentre as cirurgias a ablativa é a mais antiga e que possui maiores riscos, pois se baseia na criação de uma lesão dentro do globo pálido interno, tálamo ou núcleo subtalâmico para interromper a via hiperativa, causada pela perda da inervação dopaminérgica (LEE; YANKEE, 2021). A cirurgia de EPC foi desenvolvida como uma alternativa menos arriscada para as cirurgias ablativas bilaterais, as vias e sintomas que este tipo de cirurgia tenta mitigar é similar ao da ablativa, mas envolve uma entrega de estimulação elétrica de alta frequência incessante para os gânglios da base (LEE; YANKEE, 2021). A utilização de transplante de células pode ser considerada potencialmente um tratamento futuro para DP, células-tronco embrionárias humanas e células-tronco pluripotentes são algumas das células que estão incluídas em estudos de transplante (YASUHARA et al., 2017).

Devido ao fato de evidências indicarem que o estresse oxidativo e disfunções mitocondriais provavelmente atuam com um papel importante na patogênese da DP, a tendência da utilização de produtos naturais, principalmente plantas com ação antioxidantes, como tratamento da DP tem ganhado espaço (RABIEI et al., 2019). Estudos indicaram que uma parte dos compostos ativos de plantas medicinais e formulações de ervas tiveram efeitos positivos sobre os modelos de DP *in vitro* e *in vivo* (LI et al., 2012).

Adicionalmente, além das interações medicamentosas, todos os pacientes com DP devem ser encorajados a realizarem exercícios, desde que pratiquem em segurança, pois algumas evidências sugerem que exercícios aeróbicos praticados por longos períodos podem retardar a progressão da doença (AHLSSKOG, 2018).

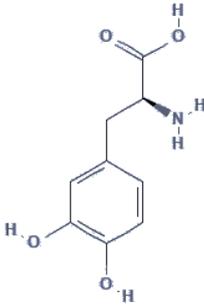
2.1.2.1. Levodopa como tratamento da Doença de Parkinson

O fármaco mais utilizado e considerada padrão ouro para o tratamento da DP hoje é o Levodopa (LD), também denominada de L-Dopa (BALESTRINO; SCHAPIRA, 2019) (ver propriedades Físico-Químicas na Tabela 1). Esse fármaco é um precursor da dopamina, que possui a função de repor os níveis deste neurotransmissor no sistema nervoso central

(BASSANI; VITAL; RAUH, 2015). A LD é convertida em dopamina pela enzima L-aminoácido aromático descarboxilase no sangue (ABBOTT, 2010).

Segundo Hornykiewicz (2010), a LD é um L-isômero natural do aminoácido D, L-dihidroxifenilalanina e foi isolado pela primeira vez do feijão-fava em 1910-1911. Posteriormente, a pesquisa realizada por Blaschko em 1942 descobriu que a enzima L-dopa descarboxilase, através da descarboxilação, converte a LD biologicamente inerte na catecolamina biologicamente ativa, a dopamina. Uma década depois, foi relatado pela primeira vez o efeito excitatório central da LD em roedores e foi sugerido a dopamina como o metabólito ativo da levodopa no cérebro (CARLSSON; LINDQVIST; MAGNUSSON, 1957). Paralelamente a isso, na década de '60 ocorre o reconhecimento que o prejuízo neuroquímico predominante da DP é uma deficiência de dopamina nas regiões do cérebro envolvidas no controle do movimento (EHRINGER; HORNYKIEWICZ, 1998). Subsequentemente, Cortzias e colaboradores (1967), com as evidências iniciais sobre o papel da LD e sua relação com a DP, trataram alguns pacientes com a doença e relataram melhorias marcantes em alguns sintomas, como acinesia, tremor e rigidez. Após a realização de vários testes e estudos, a agência federal dos EUA, *Food and Drug Administration* (FDA), aprovou a levodopa como tratamento para a DP em 1970 (HAUSER, 2017).

Tabela 1 – Propriedades Físico-Químicas da levodopa.

Nome comum	Levodopa; L-Dopa; LD.
Nome comercial do produto	Parkidopa, Prolopa, Madopar, Sinemet.
Nome da IUPAC	Ácido (S)-2-amino-3-(3,4-diidróxifenil) propanóico
Estrutura química	
Fórmula molecular	C ₉ H ₁₁ NO ₄
Peso molecular	197.17 g/mol
Solubilidade em água	5000 mg/L (a 20 ° C)

Solúvel em: a 25 °C (g/100 ml)	Prontamente solúvel em ácidos clorídrico e fórmico diluídos; Praticamente insolúvel em etanol, benzeno, clorofórmio, acetato de etila;
pKa	2.32 (25 °C)
Ponto de fusão	284-285 °C
Cor/Forma	Cristais incolores a brancos ou pó cristalino
Estabilidade	Estável. Incompatível com agentes oxidantes fortes, leve e sensível ao ar.
Descrição Física	Sólido
Odor	Sem odor
Gosto	Sem gosto

Fonte: Próprio autor (2022).

No entanto, os desafios do tratamento farmacológico com LD possuem vários efeitos neurológicos adversos, pois pacientes que responderam positivamente ao medicamento também desenvolveram flutuações motoras e discinesias (HAUSER, 2009). De acordo com Olanow et al. (2014), tem havido uma preocupação de longa data da qual a LD pode ser tóxica e acelerar a degeneração neuronal e progressão clínica, principalmente em tratamentos duradouros, como consequência de espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas pelo metabolismo oxidativo do fármaco. Contudo, não há evidências concretas, após testes *in vitro*, *in vivo* e clínicos que indiquem que o tratamento com LD seja tóxico ou que tenha um efeito adverso na taxa de progressão clínica (BASMA et al., 1995; DATLA; BLUNT; DEXTER, 2001). Diante do exposto, ainda é recomendado que os médicos continuem usando LD, mas na menor dose que forneça controle clínico satisfatório, pois a LD continua a ser o agente antiparkinsoniano mais eficaz disponível (OLANOW, 2014). Adicionalmente, o tratamento da discinesia induzida por LD precisa identificar se este efeito colateral está relacionado com a dosagem da LD, após isso, indica-se a redistribuição das dosagens e a mudança na forma de aplicação da medicação de liberação imediata para liberação prolongada para possibilidade de melhora dos efeitos colaterais da LD (ZESIEWICZ, 2019).

Além da problemática dos efeitos colaterais, os principais desafios farmacológicos enfrentados até hoje em relação à LD são sua distribuição descontínua no organismo, possui meia-vida curta, baixa biodisponibilidade e janela terapêutica estreita (TAMBASCO; ROMOLI; CALABRESI, 2018). Por exemplo, segundo Hauser (2009), apenas 1% da dose

administrada por via oral entra no cérebro para atuar efetivamente na transmissão dopaminérgica, e seu tempo meia-vida atinge apenas uma hora. Isso ocorre devido ao rápido metabolismo e depuração plasmática pela L-aminoácido aromático descarboxilase no sangue provocando efeitos colaterais periféricos, como náuseas e reduz a quantidade de LD disponível para atravessar para o cérebro (JANKOVIC, 2002; ABBOTT, 2010). Como forma de resolver e mitigar a metabolização da LD em dopamina antes de atingir o cérebro, utiliza-se uma associação com inibidor da dopa-descarboxilas (DDC), como a carbidopa e benserazida, resultando em um aumento da disponibilidade de 10 vezes no SNC, melhor perfil terapêutico, eficácia prolongada e melhor tolerabilidade (CEDARBAUM, 1987; PLETSCHER; DAPRADA, 1993; HAUSER, 2009). Complementarmente, essa associação prolonga a meia-vida periférica da LD em cerca de 90 minutos e a dose necessária é reduzida em 60-80% (CEDARBAUM, 1987; HAUSER, 2009).

2.2 NANOEMULSÕES

Nanoemulsões são dispersões de dois líquidos imiscíveis, por exemplo óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O), estabilizados pelo uso de um surfactante apropriado (MANSON et al., 2006; LIAO et al., 2020). As nanoemulsões são feitas com a utilização de surfactantes aprovados para consumo humano e substâncias alimentares comuns, denominadas “*Generally Recognized as Safe*” (GRAS) pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (LOVELYN; ATTAMA, 2011). De acordo com Aboofazeli (2010), o diâmetro médio de uma partícula de nanoemulsão é < 500 nm. Em contrapartida, Gupta et al. (2016) afirma que o tamanho de uma partícula de nanoemulsão é na ordem de 100 nm. Vale ressaltar que o diâmetro da partícula pode influenciar na aparência da nanoemulsão, segundo Capek (2004), quando o tamanho da partícula é inferior a 200 nm a emulsão possui aparência translúcida e quando possui o tamanho de 200 a 500 nm, a aparência é leitosa.

Há uma certa confusão na literatura sobre uma precisa definição de nanoemulsão, na qual confunde-se com a definição de microemulsões termodinamicamente estáveis (ANTON; VANDAMME, 2011). Essa confusão se dá pelo fato das micro e nanoemulsões possuírem escalas de tamanho parecidos, apesar de diferirem drasticamente em aspectos estruturais e estabilidade termodinâmica de longo prazo (MCCLEMENTS, 2012). As nanoemulsões são termodinamicamente instáveis, por conta disso com o decurso do tempo possibilidade de separação de fases desse tipo de emulsão aumenta, algo que não ocorre nas microemulsões. Em relação ao aspecto cinético, as nanoemulsões, por possuírem menores tamanhos que as

microemulsões, geralmente são mais estáveis por longos períodos (GUPTA et al., 2016). Além disso, as nanoemulsões são relativamente menos sensíveis às mudanças físicas e químicas, quando comparadas às microemulsões (ANTON; VANDAMME, 2011; MCCLEMENTS, 2012).

O alcance das aplicações das nanoemulsões espalha-se em diversos campos, incluindo sistema de liberação controlada de fármacos, que tem utilizado nanoemulsões de O/A para facilitar a liberação das doses dos medicamentos (ZAINOL et al., 2012; PANGENI et al., 2014; GABA et al., 2019) e na indústria alimentar, na qual utiliza-se nanoemulsões aromatizadas melhoradas com vitaminas e maior digestibilidade (OSTERTAG; WEISS; MCCLEMENTS, 2012). Essas partículas podem ser utilizadas em vários tipos de formas, como líquidos, cremes, sprays, géis, aerossóis e espumas. Também podem ser administradas por variadas vias, como a tópica, oral, intravenosa, intranasal, pulmonar e ocular (SINGH et al., 2017).

A preparação desse tipo de partícula é tipicamente realizada em um processo de dois passos na qual uma macroemulsão é primeiramente formulada e então convertida em uma nanoemulsão no segundo passo (GUPTA et al., 2016). Nas últimas décadas, a formulação de nanoemulsões tem sido focada em vários métodos, divididos em dois principais: método de alta ou baixa energia. O método de alta energia, tal como homogeneização de alta pressão (HAP) e ultrasonicação consome energia expressivamente para produzir pequenas partículas (FYRD; MASON, 2012). Por outro lado, métodos de baixa energia exploram propriedades específicas do sistema para fazer pequenas partículas sem consumir muita energia. Os dois métodos de baixa energia mais utilizados são: ponto de inversão da emulsão (PIE ou *EPI* do inglês: *emulsion inversion point*) (IZQUIERDO et al., 2002) e temperatura de inversão de fase (TIF ou *PIT* do inglês: *phase inversion temperature*) (FORGIARINI et al., 2001). Além desses dois métodos de baixa energia, as nanoemulsões podem ser formadas por meio de emulsificação espontânea, na qual a formação da partícula pode ser alcançada pelo contato de dois líquidos imiscíveis que não estão em equilíbrio sem a necessidade de entrada de energia externa (SOLANS; MORALES; HOMS, 2016).

As nanoemulsões preparadas por métodos de baixa energia frequentemente requerem grandes quantidades de surfactantes para estabilização das partículas (SINGH et al., 2017). Dito isto, uma emulsão é considerada estável quando nenhuma ou ínfima mudança ocorre em relação ao tamanho de vesícula da fase dispersa num determinado intervalo de tempo (BECHER, 2001). Pois as emulsões apresentam uma tendência natural para separar-se em

suas duas fases constitutivas diminuindo a área interfacial e conseqüentemente a energia interfacial.

A utilização desses surfactantes tensoativos não-iônicos que conferem a estabilização estérica entre as partículas, mitigando a possibilidade de coalescência, assim como pela superação da força da gravidade atuante nessas partículas pelo movimento browniano presente nesses sistemas, evitando, dessa forma, processos de instabilidade (TADROS et al., 2004; FERNANDEZ et al., 2004). O tamanho granulométrico do sistema de nanoemulsão também previne o fenômeno da coalescência, pois essas partículas não são facilmente deformáveis. A grande espessura da película interfacial, relativo ao tamanho da partícula, previne que a diminuição natural dessa película seja suficiente para causar o rompimento da partícula (IZQUIERDO et al., 2002; MOREIRA DE MORAIS et al., 2006).

Adicionalmente, algumas das excelentes propriedades das NE, como a dispersão coloidal dos agentes terapêuticos hidrofóbicos, o transporte celular por vias paracelulares ou transcelulares, impedindo que as substâncias retidas sofram degradação enzimática e/ou hidrólise, e, por fim, sua notável biocompatibilidade, tornam-nas altamente promissoras para técnicas avançadas de distribuição de fármacos (KADAPPAN et al., 2018).

Sumariamente, as nanoemulsões são consideradas um sistema de liberação de fármacos mais eficaz devido ao pequeno tamanho das partículas, natureza fluídica, capacidade de permeação eficiente, interação acentuada com as células da pele e capacidade de proteção para liberar até compostos com natureza volátil e irritante (BANDIWADEKAR et al., 2022).

2.2.1 Vantagens e Desvantagens das Nanoemulsões como Sistemas de Liberação Controlada

O atrativo das nanoemulsões para aplicação em saúde é devido as seguintes vantagens (TADROS et al., 2004; ABOOFAZELI, 2010):

1. O tamanho pequeno das partículas gera uma grande redução na força gravitacional e no movimento browniano que pode ser suficiente para superar a gravidade. Ou seja, as nanoemulsões não correm o risco de se sedimentarem ou formar nata (*creaming*);
2. O pequeno tamanho das partículas também previne qualquer floculação. Floculação fraca é prevenida e isso permite que o sistema permaneça disperso sem separação de fase;

3. O efeito da coalescência é prevenido, também por causa do pequeno tamanho, e a flutuação da superfície é prevenido pois essas partículas são elásticas;

4. Nanoemulsões são adequadas para liberação controlada de fármacos através da pele. A grande área superficial do sistema de nanoemulsão permite uma rápida ação dos bioativos;

5. Diferente das microemulsões, que requerem uma alta concentração de surfactantes (20% ou mais), as nanoemulsões podem ser preparadas menores quantidades de surfactantes;

As desvantagens do uso de nanoemulsões são as seguintes (TADROS et al., 2004; ABOOFAZELI, 2010):

1. Falta de entendimento do mecanismo de produção de partículas submicrométricas e o papel dos surfactantes e co-surfactantes;

2. Falta de demonstração dos benefícios que podem ser obtidos pelo uso de nanoemulsões quando comparado com os sistemas clássicos de microemulsão;

3. Falta de entendimento da química interfacial que está envolvida na produção das nanoemulsões;

4. As preparações de nanoemulsões por métodos de alta energia precisam de aplicação de técnicas especiais e equipamentos específicos custosos, como o uso de homogeneizadores de alta pressão e ultrasonicadores.

2.2.2 Uso de Nanoemulsão para Tratamento da DP

Nanoemulsões são potenciais carreadores para liberação eficiente de fármacos através da barreira hematoencefálica, tornando-se uma alternativa farmacológica para o tratamento da DP por LD (ZAINOL et al., 2012). Um dos objetivos das nanoemulsões é aumentar a permeabilidade ou biodisponibilidade de fármacos de baixa biodisponibilidade através da pele e membrana gastrointestinal (HARWANSI et al., 2019). Geralmente, esses sistemas são biocompatíveis, biodegradáveis, fisicamente estáveis e relativamente fáceis para produção em larga escala utilizando tecnologia comprovada (LI et al., 2008). Sua natureza não tóxica e não irritante faz desses sistemas ideais, visto que não danificam as células humanas ou animais (ABOOFAZELI, 2010).

A pesquisa realizada por Zainol et al. (2012), propôs uma formulação contendo nanoemulsão a base de óleo de palma (*Elaeis guineenses*) contendo LD. As nanoemulsões foram formuladas usando uma mistura de óleo de palma e triglicerídeo de cadeia média

contendo LD como fase oleosa dispersa e como fase aquosa contínua, o surfactante (Cremophor EL) e glicerol em água desionizada. A formulação foi realizada pelo método de alta energia por meio de um homogeneizador de alta pressão a 4000 rpm. As variáveis de resposta foram tamanho de partícula (109,6 nm), potencial zeta (-31,06 mV) e o índice de polidispersão (0,17 PDI). Por fim, foi observado que a formulação otimizada com as características acima permaneceu estável por seis meses a 4 °C.

No trabalho apresentado por Pangen et al. (2014) foi proposto uma formulação de nanoemulsão com resveratrol e vitamina E. A nanoemulsão foi preparada pelo método de emulsificação espontânea, seguida de homogeneização por alta pressão. A formulação utilizou vitamina E e sefsol (1:1) como fase oleosa, Tween 80 como surfactante, Transcutol P como co-surfactante e resveratrol. A fase aquosa consistiu em água destilada. As formulações preparadas foram avaliadas em relação ao tamanho, potencial zeta, índice de refração, viscosidade e liberação *ex vivo*. Como resultados foi observado vesículas esféricas com um diâmetro de $102 \pm 1,46$ nm, índice de polidispersão de 0,158 e valores ótimos de potencial zeta de $-35 \pm 0,02$. A liberação *ex vivo* apresentou uma porcentagem cumulativa do fármaco de $85,48 \pm 1,34\%$ após 24 h. Por fim, foi observado nos resultados histopatológicos um decréscimo nas alterações degenerativas nos grupos que foram administradas nanoemulsões de resveratrol. A liberação percentual cumulativa de fármaco para a suspensão pré-homogeneizada de resveratrol, a nanoemulsão pré-homogênea e a nanoemulsão pós-homogeneizada foram de $24,18 \pm 2,30\%$, $54,32 \pm 0,95\%$ e $88,57 \pm 1,92\%$, respectivamente, após 24 h.

O estudo realizado por Gaba et al. (2019) teve como objetivo desenvolver uma formulação de nanoemulsão de naringenina contendo vitamina E para uma liberação direta entre o nariz e o cérebro para melhor controle dos sintomas da DP. O método para formular a nanoemulsão foi o de titulação de fase aquosa. A fase oleosa consistiu em vitamina E, o óleo (Capryol 90), o surfactante (Tween 80) e o co-surfactante (Transcutol-HP), a fase aquosa continha água destilada. A formulação otimizada foi avaliada quanto ao tamanho das vesículas, índice de polidispersão (PDI), índice de refração, transmitância, potencial zeta e viscosidade. Após a definição da formulação otimizada, múltiplos estudos avaliaram parâmetros comportamentais em ratos como modelo animal para analisar a eficiência da nanoemulsão como tratamento da DP. Os resultados obtidos para formulação otimizada, a nanoemulsão apresentou tamanho de vesícula de $38,70 \pm 3,11$ nm, PDI de 0,14, potencial zeta de $-27,4 \pm 0,14$ mV e viscosidade de $19,67 \pm 0,25$ Pa.s. Os resultados dos estudos

comportamentais mostraram que a PD foi parcialmente revertida com sucesso quando administrada com a nanoemulsão de naringenina intranasal juntamente com a LD.

Júnior et al. (2021) realizaram um estudo comparando os efeitos da curcumina nanoemulsionada contra a curcumina livre para tratamento de camundongos induzidos para sintomas *DP-like* por rotenona. As nanoemulsões continham 1,5 mg/mL de curcumina e tiveram um tamanho aproximado de 20 nm, PDI de 0,250 e potencial zeta de -14,8. Os grupos de animais experimentais receberam os dois tratamentos por via oral durante 30 dias e após isso avaliaram parâmetros motores e mensuraram marcadores de estresse oxidativo e a atividade do complexo mitocondrial I dos tecidos cerebrais. Em ambos os tratamentos foi observado melhoras nos problemas motores, reduções da lipoperoxidação e prevenção da inibição do complexo I. No entanto, o grupo tratado com a curcumina nanoemulsionada demonstrou uma prevenção das alterações motoras e da prevenção da inibição do complexo I mais efetivas quando comparada ao fitoterápico na forma isolada.

2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

O interesse no uso de medicamentos derivados de plantas, como alternativa de tratamento para várias doenças, aumentou significativamente em todo mundo, estima-se que cerca de 64% das medicações terapêuticas disponíveis são derivadas de fontes naturais, principalmente de plantas (VALLI et al., 2013). Esse crescente interesse no emprego de compostos derivados de plantas em tratamentos modernos é devido a ampla variedade moléculas fitoquímicas que revelaram benefícios protetores e terapêuticos em muitas indicações para tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (DP) (SHAHPIRI et al., 2016).

Diante disso, o Brasil detém a flora com a maior biodiversidade no mundo, compreendendo mais de 45,000 espécies de plantas superiores (cerca de 20 – 22% da biodiversidade mundial), de acordo com o Sistema de informação sobre a biodiversidade brasileira – SiBR (2018). No entanto, apesar de possuir uma grande biodiversidade e um grande interesse científico nesse tópico, o mercado brasileiro de medicamentos derivados de plantas ainda é muito modesto. Estima-se que esse mercado movimentava cerca de 261 milhões de dólares anuais, porém representa menos de 5% do mercado total de fármacos, que é avaliado em cerca de 28 bilhões de dólares (DUTRA et al., 2016). Nesse sentido, o Brasil possui a oportunidade para estabelecer um modelo de desenvolvimento próprio para o uso de

plantas medicinais e fitoterápicos na área de saúde, que priorize o uso sustentável desses componentes da biodiversidade.

Um dos compostos que se destaca entre fármacos derivados de plantas são os óleos essenciais (OEs). Os termos "óleo essencial", "óleo volátil", "óleo etérico" são usados para denominar uma substância líquida contida em células especializadas de plantas, e que é obtida usando certos métodos de extração (GUTTERIDGE, 2014). Do ponto de vista químico, óleos essenciais possuem misturas complexas de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, aldeídos, álcoois, ésteres e outros constituintes, mas a classe de compostos predominantes é representada pelos terpenóides (DA COSTA et al., 2017). Os óleos essenciais contêm centenas de bioestruturas formadas por diferentes moléculas, cada uma com propriedades específicas (antisséptico, antibacteriano, imunoestimulante, descongestionante etc.), segundo Samfira et al. (2015).

2.3.1 Utilização de Óleos essenciais no tratamento da DP

As desordens neurodegenerativas são geralmente caracterizadas por fortes evidências de estresse oxidativo em suas patogêneses, como consequência da síntese desregulada de ERO (YAN et al., 2013). Entre os fatores que contribuem para essa desregulação estão a disparidade entre mecanismos celulares pró-oxidantes e antioxidantes inter-relacionados com disfunção mitocondrial, peroxidação lipídica, processos neuroinflamatórios e metabolismo endógeno da dopamina (SARRAFCHI et al., 2016).

Além disso, as doenças neurodegenerativas são atualmente incuráveis e as terapias disponíveis apenas controlam os sintomas ou prolongam o crescimento da doença (RASHED et al., 2021). Diante das dificuldades apresentadas nos tratamentos convencionais da DP, abordagens alternativas têm sido adotadas, como a utilização de medicamentos fitoterápicos ou associação entre compostos de plantas medicinais e fármacos tradicionais (MYTHRI; HARISH; BHARATH, 2012). Por isso, os OEs têm sido propostos como estratégias preventivas e de tratamento subjacentes para doenças antienvhecimento e neurodegenerativas (FORRESTER et al., 2014).

Estudos indicaram que uma parte dos compostos ativos de plantas medicinais e formulações de ervas tiveram efeitos positivos sobre os modelos de DP *in vitro* e *in vivo* (LI et al., 2012). Um desses estudos foi realizado por MOHANASUNDARI e SABESAN (2007), que examinaram o efeito protetor do OEs de hipérico (*Hypericum perforatum*) em camundongos injetados com MPTP como modelo de DP-like. Esses autores observaram que o

tratamento com o OE resultou em uma inibição da atividade da monoamina oxidase-B e redução da ativação de astrócitos na área estriatal induzida por MPTP. Guo et al. (2007) demonstrou que o extrato das folhas de chá-da-índia (*Camellia sinensis*), em estudo *in vitro*, atenuou a morte celular induzida por 6-OHDA nas células SH-SY5Y e o risco da DP em rato.

Em outra pesquisa, realizada por Zhang et al., (2012), foi utilizado o *zebrafish* como modelo animal de DP-like após injeções de 6-OHDA para entender o efeito neuroprotetivo da *Alpinia* (*Alpinia oxyphylla*). Como resultados, os autores observaram que o OE preveniu e restaurou a degeneração de neurônios dopaminérgicos e atenuou os déficits da atividade locomotora causados pela 6-OHDA. No estudo realizado por Ramazani et al. (2020), foi utilizado o extrato hidroalcoólico do óleo essencial de canela-da-índia (*Cinnamomum verum*) e canela-da-china (*C. cassia*) em modelo de DP *in vitro* de células PC12 induzidas à citotoxicidade e apoptose pela exposição à 6-OHDA. Os efeitos protetores dos OEs foram determinados pela medição da viabilidade celular, quantidade de ERO e apoptose. Os pesquisadores observaram que o 6-OHDA provocou morte e apoptose celular nos grupos não tratados, enquanto as células pré-tratadas com 20 µg/mL de OEs aumentaram a viabilidade e diminuíram a quantidade de ERO significativamente. Desta forma, os autores concluíram que os OEs de canela podem ser efetivo contra a citotoxicidade do 6-OHDA.

Entre estudos com plantas brasileiras, destacam-se a utilização de componentes de *Croton celtidifolius*, popularmente conhecida como Sangue de Dragão e distribuída na região Sul e Sudeste, por possuir atividade neurobiológicas, com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, importantes para inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (MOREIRA et al., 2010). No estudo de Shi et al. (2013) foi observado o efeito neuroprotetor de *Uncaria tomentosa*, conhecida popularmente como Unha de Gato com distribuição na região Norte e Centro-Oeste, no qual aumentou a viabilidade celular e o potencial da membrana mitocondrial de células *in vitro*. Na pesquisa realizada por Chies et al (2013) foi observado propriedades antioxidantes, eliminação de radicais livres e minimização de danos oxidativos, fatores que podem causar DP na espécie *Lippia alba*, comumente conhecida como Verbena Índia, distribuída em todo Brasil.

2.3.2 Pimenta negra (*Piper nigrum*)

A pimenta negra (*P. nigrum*) pertencente à família Piperaceae, é uma das especiarias mais populares utilizadas em todo o mundo e é nativa do sul da Índia (TAKOOREE et al., 2019). A pimenta preta é uma trepadeira perene que cresce bem na sombra com árvores ou

postes de apoio, possui 10-20 raízes adventícias primárias desenvolvidas a partir de a base do caule maduro (ASHOKKUMAR et al., 2021). O aroma e a pungência da pimenta preta são atribuídos principalmente à piperina e aos óleos voláteis (SRINIVASAN, 2007).

O óleo essencial de pimenta preta constitui aproximadamente 0,4-7% do peso seco do fruto e é benéfico para a gestão de reumatismo, frio, cansaço, dores musculares, dores, infecções e foi usado como um nervo estimulante para melhorar a circulação sanguínea (ASHOKKUMAR et al., 2021). A pimenta negra é usada há milênios por possuir propriedades organolépticas e nutricionais e por isso tem sido usado na medicina tradicional e moderna (ASHOKKUMAR et al., 2021).

Na pesquisa realizada por Shrivastava et al. (2013), a utilização de fitoquímicos isolados da pimenta negra (*Piper nigrum*) como um tratamento oral melhorou a capacidade de aprendizagem cognitiva no modelo de rato DP-like induzido por 6-OHDA. Devido a estes resultados, os autores sugeriram que a propriedade antioxidante dos fitoquímicos da pimenta negra foi demonstrada pelo seu mecanismo anti-apoptótico e anti-inflamatório no modelo de DP-like induzido por 6-OHDA.

2.4 MODELOS ANIMAIS NO ESTUDO DE DOENÇAS

A descoberta de novos tratamentos para uma doença complexa como o Parkinson necessita da realização de estudos pré-clínicos em modelos animais para responder questões cruciais sobre a eficácia e segurança dos novos tratamentos (LARIJANI et al., 2019). Devido a isso, a escolha de uma espécie animal adequada, considerando as similaridades anatômicas, fisiológicas, comportamentais e genéticas com o ser humano, é de suma importância para realização de estudos *in vivo* (POTASHKIN et al., 2011). Além disso, outro fator importante para o estudo de um modelo animal é a possibilidade de um alto nível de replicabilidade (CARAMILLO; ECHEVARRIA, 2017).

A utilização de modelos de células humana para estudos *in vitro* para fornecer informações é eticamente mais adequada que a experimentação em animais, porém esses modelos ainda não replicam totalmente as interações multissistêmicas observadas na doença humana ou em modelos animais *in vivo* (DOYLE; CROLL, 2022). Devido a este fato, a substituição completa da modelagem animal em experimentos ainda não é viável (LARIJANI et al., 2019).

Os modelos animais mais tradicionais utilizados para estudar doenças humanas são camundongos, ratos e primatas não-humanos, pois possuem anatomia e fisiologia

relativamente similar a dos humanos (LARIJANI et al., 2019; DOYLE; CROLL, 2022). No entanto, existem alguns argumentos éticos contra a utilização de animais em experimentos, principalmente mamíferos, mas a regra dos 3Rs (substituição, redução e refinamento, do inglês: *replacement, reduction, and refinement*) é quase um princípio universal e amplamente aceitável para utilização ética de animais (LARIJANI et al., 2019). Apesar da similaridade desses modelos tradicionais com os seres humanos, a utilização dos camundongos e ratos, mesmo sendo animais de pequeno porte, ainda é custosa para se manter e a produção de linhagens transgênicas é bastante trabalhosa (JUCKER, 2010).

Em contrapartida, invertebrados têm sido utilizados por vários anos como modelos animais em estudos médicos, como a mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, e o nematoídeo, *Caenorhabditis elegans* (DOYLE; CROLL, 2022). Estes invertebrados são bastante utilizados por possuírem os mesmos processos celulares básicos e funções genéticas básicas dos mamíferos, mas com a vantagem de serem menos custosos na manutenção e adequados para experimentos em larga escala (SÉGALAT, 2007). Entretanto, a falta de estrutura cerebral e órgãos similares aos humanos impossibilita a mimetização com precisão de doenças humanas (DOYLE; CROLL, 2022).

Alternativamente aos modelos mamíferos e invertebrados, a espécie de peixe teleósteo *Danio rerio* (popularmente denominada na literatura como *zebrafish*) tornou-se amplamente estabelecida como um modelo para estudo de doenças humanas nos últimos anos. O *zebrafish* possui como vantagem a combinação da versatilidade e a possibilidade de estudos em larga escala dos invertebrados com as semelhanças anatômicas e fisiológica dos modelos mamíferos tradicionais (DOYLE; CROLL, 2022).

2.4.1 Uso de *Danio rerio* (Hamilton, 1822) como Modelo Animal

Danio rerio (Figura 1) é um pequeno vertebrado aquático que tem sido amplamente utilizado como organismo modelo em diversos estudos neurocomportamentais, farmacológicos, toxicológicos e na investigação de inúmeras doenças humanas (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009; SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012; AHMAD; RICHARDSON, 2013; LIU et al., 2016; VAZ; OUTEIRO; FERREIRA, 2018). Essa espécie tem sido usada pela ciência desde o final da década de 1960 como um modelo animal, principalmente por ser adequada para ensaios *in vivo* em larga escala devido ao seu pequeno tamanho e rápida reprodução (GRUNWALD; EISEN, 2002; VAZ; OUTEIRO; FERREIRA, 2018).

Figura 1 – *Danio rerio* adulto criado no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal – LECA – UFRPE.



Fonte: Próprio autor (2022)

A espécie *D. rerio*, de acordo com dados obtidos de coleções originais, possivelmente possui origem no Sul da Ásia entre o Paquistão, Índia, Mianmar e Nepal (ENGESZER et al., 2007). São peixes teleósteos de pequeno porte (3 a 4 cm de comprimento) pertencentes à família Cyprinidae, popularmente conhecidos no Brasil como paulistinha e *zebrafish* mundialmente (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012). A espécie possui preferência pela região tropical, vive em águas doces com temperatura em 26 °C (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012).

Adicionalmente, o desenvolvimento do *zebrafish* é rápido e possui um curto ciclo de vida de aproximadamente 3 anos (NAGEL, 2002). A espécie possui embriões e larvas transparentes durante a primeira semana após fertilização, a cada 2 a 3 dias as fêmeas colocam cerca de 200 a 300 ovos, com rápido desenvolvimento, transformam-se de ovo a larva (Figura 2) em 48 a 72 horas e se tornam adultos em 3 meses de vida (GRUNWALD; EISEN, 2002; SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012; SARACENI et al., 2016; VAZ; OUTEIRO; FERREIRA, 2018).

Figura 2 – Larva de *Danio rerio* com 144 horas pós-fertilização criado no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal – LECA – UFRPE.



Fonte: Próprio autor (2022)

Diante do exposto, são peixes que possibilitam uma fácil manutenção e aquisição, possuem baixos custos para sua criação e apresentam alta taxa de fecundidade, desenvolvimento externo rápido e bem caracterizado (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012; SELDERSLAGHS et al., 2009). Selderslaghs et al. (2009) e Liu et al. (2016) afirmam que o *zebrafish* tornou-se um peixe modelo para uso geral na ciência por ser viável economicamente e possuir vantagens no estudo da toxicidade aquática. Entre as vantagens estão a facilidade de alimentação, serem sensíveis à produtos químicos e os experimentos com *zebrafish* podem ser adaptados para métodos de médio a alto rendimento, sendo eficiente em relação aos custos e tempo. A transparência óptica é outra vantagem deste teleósteo, pois possibilita a observação direta de e processos fisiológicos *in vivo* e em tempo real (VAZ; OUTEIRO; FERREIRA, 2018). Como também a administração de fármacos é facilitada através do ambiente aquoso, e a eficácia, biodisponibilidade e toxicidade podem ser prontamente determinadas (VAZ; OUTEIRO; FERREIRA, 2018).

Adicionalmente, outro fator favorável ao *zebrafish*, apesar das evidentes diferenças, é uma certa homologia fisiológica e genômica quando comparado aos humanos (BASNET et al., 2019). A espécie possui o genoma completo sequenciado e disponível em banco de dados, com cerca de 71% de similaridade genética com o ser humano e um alto grau de conservação nas propriedades funcionais de muitas proteínas codificadas, já os camundongos de laboratório possuem cerca de 85% (WILLIAMS; HONG, 2011; HOWE et al., 2013; VAZ; OUTEIRO; FERREIRA, 2018). Desta forma, muitos dos genes envolvidos nas doenças neurodegenerativas humanas foram identificados no *zebrafish* e os seus padrões de expressão são conhecidos ou facilmente estudados (PANULA et al., 2010). A semelhança fisiológica e

anatômica também é evidenciada na maioria dos órgãos, incluindo o sistema nervoso (WILLIAMS; HONG, 2011). É uma espécie com padrões fisiológicos e genômicos homólogos aos mamíferos, no qual permite aos pesquisadores sondar novos caminhos e mecanismos relevantes para patogênese humana e tratamentos clínicos (SHIN; FISHMAN, 2002; FONSEKA et al., 2016).

Diante das distintas vantagens no uso do *zebrafish* em pesquisas, esta espécie possibilita diferentes tipos de estudos comportamentais. Diversos estudos utilizaram avaliações comportamentais de *zebrafish* em estudos de ansiedade (AHMAD; RICHARDSON, 2013), como um modelo de resposta ao estresse e efeitos de fármacos ansiolíticos (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009). *Zebrafish* pode ser usado para estudar os mecanismos neurais de uma variedade de tipos de comportamento (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009). Ainda, a retina do *zebrafish* possui semelhança com a dos seres humanos e possui capacidade de visualizar e discriminar cores (SHIN; FISHMAN, 2002; AHMAD; RICHARDSON, 2013). Além da capacidade de discriminação de cores, adultos de *zebrafish* também são capazes de aprendizagem condicionada que se baseia na cor como uma sugestão de condicionamento (AHMAD; RICHARDSON, 2013). Por exemplo, *zebrafish* adultos eram treinados com sucesso para forragear alimentos de uma determinada cor que correspondesse ao tipo (cor) dos alimentos aos quais eles estavam expostos desde o início da vida (SPENCE et al., 2007; AHMAD; RICHARDSON, 2013).

Por fim, a pesquisa com *zebrafish* oferece várias vantagens, dentre elas estão: *i.* tamanho pequeno das formas larval e adulta; *ii.* embriões transparentes; *iii.* menor custo na manutenção e alojamento; *iv.* fertilização externa relativamente rápida; *v.* capacidade reprodutiva robusta em laboratórios padronizados; *vi.* métodos quantitativos de comportamento em vários indivíduos diferentes concomitantemente; *vii.* possibilita a realização de estudos de alto rendimento; *viii.* pode facilitar na compreensão dos mecanismos neurofarmacológicos *in vivo* promovendo descoberta de novos fármacos (BENCAN et al., 2009; CHAMPAGNE et al., 2010; PANULA et al., 2010; NGUYEN et al., 2013; DOYLE; CROLL, 2022).

2.4.2 Utilização da espécie *Danio rerio* para estudos sobre DP

Como já relatado na literatura, a espécie *D. rerio* é um dos modelos animais que estão sendo mais utilizados para diversos tipos de pesquisas, principalmente em neuropatologias, pois se adequa à ensaios *in vivo* em larga escala, devido ao seu pequeno tamanho e rápida

reprodução. Como outras vantagens, a indução à DP e administração dos fármacos são facilitadas através do meio aquoso e a eficácia, biodisponibilidade e toxicidade podem ser prontamente determinadas (VAZ; OUTEIRO; FERREIRA, 2018). A transparência óptica é outra vantagem deste teleósteo, pois possibilita a observação direta de processos celulares e fisiológicos *in vivo* e em tempo real (VAZ; OUTEIRO; FERREIRA, 2018). A utilização do *zebrafish* como modelo animal para estudos da DP permite o uso de metodologias de baixos custos e eficientes para avaliação de parâmetros dos sintomas motores, como atividade locomotora e dormência, e sintomas não motores, como comportamento animal, preferência olfatória e ansiedade (DOYLE; CROLL, 2022).

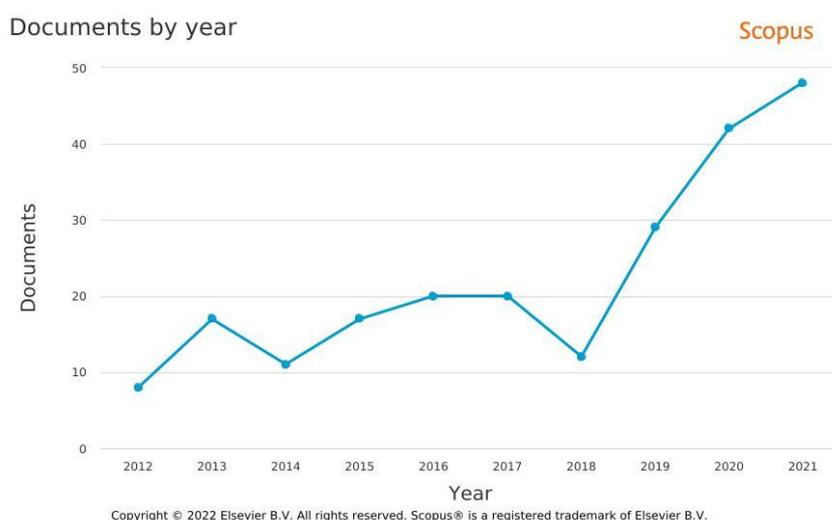
O cérebro do *zebrafish* é comparável ao cérebro dos mamíferos, com seções do cérebro anterior, médio e posterior também contendo o diencéfalo e telencéfalo e a função do neurotransmissor primário é geralmente similar à dos humanos (PANULA et al., 2010; CARAMILLO; ECHEVARRIA, 2017). Outra característica anatômica cerebral também presente em *zebrafish* é a presença da barreira hematoencefálica, que atua fisiologicamente com a permeabilidade semelhante a encontrada nos seres humanos (WAGER; RUSSELL, 2013). Devido a estas características, o *zebrafish* é um modelo ideal de neurociência comportamental pois o *zebrafish* também possui uma série de processos cognitivos, como os humanos, incluindo aprendizado, memória, medo, ansiedade, percepção, habilidades sociais e até mesmo padrão de sono (OLIVEIRA, 2013; CADENA et al., 2020a). Para acessar estas respostas comportamentais de *zebrafish*, vários testes bem desenvolvidos estão se tornando cada vez mais disponíveis, como o teste de tanque novo e teste do espelho que são usados para mensurar ansiedade (RAZALI et al., 2021). No teste de tanque novo o *zebrafish* que exhibe altos níveis de ansiedade passam mais tempo na borda do tanque que no centro, comportamento conhecido como tigmotaxia, que pode ser facilmente mensurado (HAGHANI et al., 2019; CADENA et al., 2021).

A indução do *zebrafish* para se tornar um modelo animal com sintomas semelhantes à DP (DP-like) decorre de duas formas distintas: i. modelo induzido por neurotoxinas, dentre as mais utilizadas estão o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridna (MPTP), a 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), o paraquat e a rotenona (KALYN M, et al., 2020); ii. modelo de linhagens transgênicas de *zebrafish* que expressam genes mutados direcionados para imitar a DP autossômica dominante ou recessiva em humanos (RAZALI et al., 2021).

O *zebrafish* como espécie utilizada no modelo para indução de sintomas semelhantes à DP tem ganhado cada vez mais força, nos últimos 10 anos foram publicados 251 artigos relacionando a DP com *zebrafish* nas mais variadas formas de estudos e tipos de indução

(Figura 3). Para encontrar esse número de publicações, a seguinte estratégia de pesquisa foi utilizada na base de dados *Scopus* na data 15/05/2022: Título, resumo, palavras-chave: (“*Parkinson’s disease*” OR “*Parkinsons disease*” OR “*parkinsonism*” AND “*zebrafish*” OR “*Danio rerio*”); Ano: 2012 - 2021; Tipo de documento: artigo científico; Estágio de publicação: versão final; Tipo de fonte: revistas científicas; Língua: apenas inglês.

Figura 3 – Número de artigos publicados encontrados na base de dados *Scopus* relacionados com Doença de Parkinson e *zebrafish* durante 2012 – 2021.



Fonte: Scopus (2022)

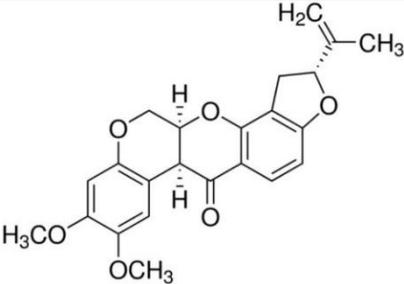
2.4.3 Utilização da rotenona para indução de sintomas DP-like

Para avaliar novos tratamentos para a DP, emprega-se modelos de indução à DP em animais com neurotoxinas já padronizadas, como a rotenona. A rotenona é uma toxina natural derivada das raízes, sementes e caules de algumas plantas tropicais, incluindo espécies de *Derris*, *Tephrosia*, *Lonchocarpus* e *Mundulea*, oriundas do sudeste da Ásia, as ilhas do Pacífico e a América do Sul (RADAD et al., 2019). A rotenona é comercializada no mundo todo como pesticida e na aquicultura, é utilizada para eliminar peixes e outros organismos indesejados dos sistemas de produção e nos ecossistemas naturais tem sido utilizado para controlar espécies de peixes invasoras (NANDA et al., 2009; MELO et al., 2015). Esta toxicidade em peixes é provavelmente devido à grande área de superfície sobre a qual a rotenona é absorvida, as brânquias (INNOS; HICKEY, 2021). Os seres humanos expostos a altos níveis de rotenona são 2,5 vezes mais propensos a desenvolver sintomas do tipo parkinsoniano do que a população em geral (TANNER et al., 2011). Devido a este fato, o uso

da rotenona como pesticida e inseticida não é mais permitido nas plantações terrestres ou em pecuária nos EUA e foi banido na União Europeia (INNOS; HICKEY, 2021).

A rotenona (ver propriedades Físico-Químicas na Tabela 2) se apresenta como um pó cristalino inodoro e incolor a acastanhado que pertence a uma classe de compostos de estrutura molecular relacionada como isoflavonas (RADAD et al., 2019). Esta substância é insolúvel em água, porém é muito solúvel em vários solventes orgânicos, como o dimetilsulfóxido (DMSO), e possui alta sensibilidade à luz e oxigênio (RADAD et al., 2019). A decomposição da rotenona depende de vários fatores como temperatura, pH, luz solar, concentração e presença de detritos orgânicos (RADAD et al., 2019). Em condições de laboratório é considerada mais estável, com tempo de meia-vida entre 13 e 22 dias até 17 °C (MARKING; BILLS, 1976).

Tabela 2 – Propriedades Físico-Químicas da rotenona.

Nomes comuns	Rotenona, Dactinol, Paraderil, Barbasco.
Nome comercial do produto	Rotenona - $\geq 95\%$
Número CAS	83-79-4
Nome da IUPAC	(2R,6aS,12aS)-1,2,6,6a,12,12a-hexahidro-2-isopropenyl-8,9-dimethoxychromeno[3,4-b]furo(2,3-h)chromen-6-one
Estrutura química	
Fórmula molecular	$C_{23}H_{22}O_6$
Peso molecular	394,41 g/mol
Solubilidade em água	0,17 mg/L em 25 °C
Solúvel em:	Prontamente solúvel em acetona, dissulfeto de carbono, acetato de etila e clorofórmio;
a 25 °C (g/100 ml)	Praticamente insolúvel éter dietílico, álcoois, éter de petróleo e tetracloreto de carbono;
Ponto de fusão	176 °C

Cor/Forma	Cristais incolores a acastanhados ou um pó cristalino branco a branco acastanhado.
Estabilidade	Decompõe-se por exposição à luz e ao ar.
Descrição Física	Sólido
Odor	Sem odor
Gosto	Sem gosto

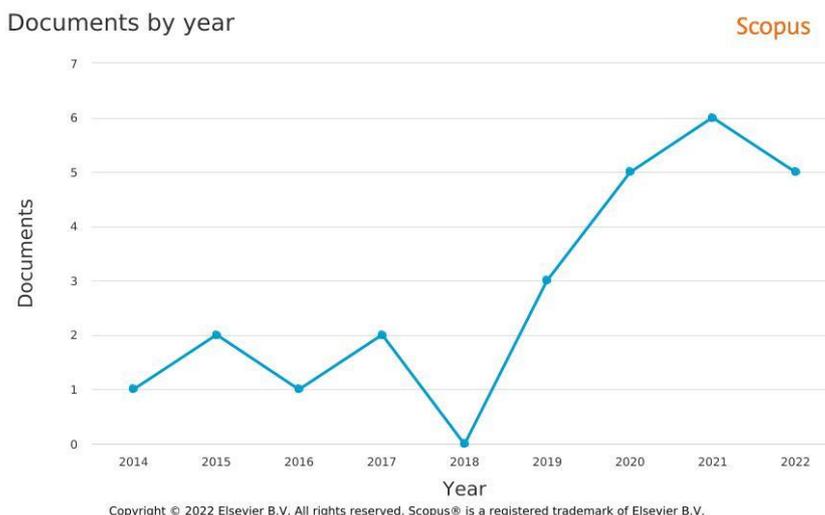
Fonte: Próprio autor (2022).

Assim como o MPTP, a rotenona é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica por ser um composto lipofílico e inibe a atividade do complexo mitocondrial I, proporcionando um ambiente de estresse oxidativo na célula, prejudicando o metabolismo energético e, eventualmente, causa a perda neuronal da dopamina (JAGTAP; MAKHIJA, 2014; BISBAL; SANCHEZ, 2019). A rotenona como agente de indução à sintomas *DP-like* em modelos animais ganhou destaque a partir do ano 2000 com a pesquisa realizada por Betarbet et al., (2000), que conseguiu reproduzir duas características da DP, perda de neurônios dopaminérgicos e formação de corpos do tipo Lewy, em ratos expostos à rotenona por inalação. Após este fato, a rotenona continuou a ser utilizada como composto químico indutor de *DP-like* em modelos animais por possuir as seguintes características: *i.* alta lipofilicidade que permite ultrapassar a barreira hematoencefálica; *ii.* implicar em várias vias patogênicas que provocam morte dos neurônios dopaminérgicos, como estresse oxidativo, agregação da α -sinucleína e formação dos corpos de Lewy; *iii.* capacidade de reproduzir distúrbios olfatórios e gastrointestinais (CANNON et al., 2009; RADAD et al., 2019).

Em relação ao *zebrafish*, a utilização da rotenona para indução de sintomas *DP-like* é relativamente recente e possui poucos estudos publicados na literatura, aproximadamente 10% dos estudos publicado nos últimos dez anos que utilizam o *zebrafish* para estudos com a DP (Figura 3) foram com rotenona. No entanto, nos últimos quatro anos a publicação deste tema está progressivamente aumentando. O total de publicações encontradas na base de dados *Scopus* no período entre 2012 e 2022 foi de 25, sendo que 19 publicações foram realizadas no período de 2019 até 2022 (Figura 4). Os anos 2012 e 2013 não apresentaram artigos publicados, por essa razão o gráfico tem como ano inicial 2014. A estratégia de pesquisa utilizada para encontrar os artigos na base de dados *Scopus* na data 15/06/2022 foi esta: *Título, resumo, palavras-chave:* ("Parkinson's disease" OR "Parkinsons disease" OR "parkinsonism" AND "*zebrafish*" OR "Danio rerio" AND "Rotenone"); *Ano:* 2012 - 2022;

Tipo de documento: artigo científico; *Estágio de publicação:* versão final; *Tipo de fonte:* revistas científicas; *Língua:* apenas inglês.

Figura 4. Número de artigos publicados encontrados na base de dados *Scopus* relacionados com Doença de Parkinson, *zebrafish* e rotenona durante 2014 – 2022.



Fonte: Scopus (2022)

No estudo realizado por Khotimah et al. (2015) em que expôs adultos de *zebrafish* à rotenona, foi avaliado os efeitos protetores do extrato da planta *Centella asiatica* sobre a agregação de α -sinucleína. Os animais foram expostos à 2, 5 e 10 $\mu\text{g/L}$ de rotenona por 28 dias concomitantemente à extrato metanólico de *C. asiatica*. Os parâmetros avaliados pelos autores foram: nível de dopamina e α -sinucleína no cérebro, imuno-histoquímica e atividade locomotora. O teste de atividade locomotora foi observado uma diminuição no movimento de natação espontânea dos animais tratados com 5 $\mu\text{g/L}$ de rotenona. Nos grupos com o extrato da planta e rotenona a motilidade foi semelhante ao do grupo controle. O nível de dopamina nos grupos de *zebrafish* expostos à rotenona diminuiu, mas o grupo contendo também o extrato de *C. asiatica* foi observado aumento no nível.

O estudo realizado por Wang et al. (2017), no qual empregou 2 $\mu\text{g/L}$ de rotenona para avaliar a indução à sintomas motores e não motores semelhantes à DP em *zebrafish* adultos. Diferentemente do trabalho de Khotimah et al. (2015), o foco de Wang e colaboradores consistiu em mensurar uma maior gama de parâmetros, como atividade locomotora, ansiedade a partir do teste de preferência de claro/escuro, acuidade olfativa e níveis de dopamina. Em relação à atividade locomotora foi observado uma diminuição do tempo de natação em velocidade rápida dos animais expostos à rotenona em comparação ao controle. No teste de

preferência de claro/escuro os animais expostos à rotenona passaram mais tempo no compartimento claro, refletindo comportamentos semelhantes a ansiedade e depressão. Ademais, foi registrado uma redução da acuidade olfatória, devido ao fato que houve uma redução do interesse mostrado pelos peixes na isca olfativa. Segundo Wang et al., (2017), todos esses parâmetros comportamentais foram associados com a diminuição dos níveis de dopamina nos cérebros dos indivíduos expostos à rotenona.

A exposição de embriões de *zebrafish* à 0, 5, 10, 20, 40 e 80 µg/L de rotenona foi utilizada para estimar concentração letal e analisar alterações embrionias (MELO et al., 2015). Como resultado, estes autores observaram que a rotenona induziu mortalidade significativa nos embriões com uma LC₅₀ de 96-h de 12,2 µg/L, além de observarem formação de edemas cardíacos, deformações na cauda, atraso no desenvolvimento e perda de equilíbrio.

Em outro estudo que expôs larvas de *zebrafish* à rotenona em uma concentração de 50 nM resultou em uma redução locomotora moderada e redução na quantidade de neurônios dopaminérgicos no diencéfalo ventral (KALYN et al., 2020). No entanto, a natureza tóxica da rotenona à peixes dificulta a determinação de uma dose ótima que reduz de forma eficiente neurônios dopaminérgicos com baixa mortalidade (KALYN et al., 2020). Ainda, segundo Melo et al. (2015), o limite entre as concentrações de rotenona que podem causar efeitos negativos e as concentrações que não provocam efeitos é bastante estreito.

2.4.4 Outras neurotoxinas utilizadas para indução de sintomas DP-like

Como já mencionado anteriormente, a causa exata da DP ainda é incerta, porém várias hipóteses são atribuídas a heranças genéticas, drogas e fatores ambientais, como pesticidas e metais pesados (ZESIEWICZ, 2019). Devido a isso, a administração de alguns compostos químicos está sendo usada para estudos de DP em modelos animais pois podem influenciar o metabolismo celular gerando sintomas semelhantes à doença (ROBEA et al., 2020).

O primeiro composto químico a ser utilizado com o propósito de induzir DP em modelos animais foi o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP), uma toxina ambiental perigosa e um narcótico obtido como subproduto, que induz acidentalmente sintomas de DP em humanos (LANGSTON, 2017). Uma característica importante para o MPTP ser utilizado para induzir sintomas semelhantes à DP é ser altamente lipofílico e capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e ser convertido no metabólito iônico 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP⁺) pela monoamina oxidase B (LANGSTON, 2017). Este composto, relativamente simples, que pode causar degeneração seletiva da substância nigra após

administração sistêmica, pode matar neurônios dopaminérgicos em *zebrafish* nos estágios embrionários, larval e adulto (KALYN et al., 2020). Em um estudo com *zebrafish* adultos que recebeu injeção intraperitoneal de MPTP foi observado um decréscimo no comportamento de natação e aumento de tempo parado como resposta ao estresse da indução (BABU et al., 2016). Quando a larva de *zebrafish* foi exposta por imersão por MPTP observaram perda de 39% dos neurônios dopaminérgicos no diencéfalo ventral (KALYN et al., 2020).

O 6-OHDA é outra neurotoxina bastante utilizada para induzir os principais sintomas parkinsonianos, sendo uma forma hidroxilada de dopamina, sintetizada endogenamente em menor quantidade no cérebro (HERNANDEZ-BALTAZAR et al., 2018). Esta substância age na inibição do complexo mitocondrial I e IV, e na auto-oxidação resultando em espécies reativas de oxigênio (ROBEA et al., 2020). Diferentemente do MPTP, a 6-OHDA não possui a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e por esse motivo, as lesões neuronais são induzidas em modelos animais por injeção direta no corpo estriado (THIRUGNANAM; SANTHAKUMAR, 2022). A indução de *zebrafish* DP-like pela exposição da 6-OHDA em embriões e larvas ocorre por imersão contendo a solução com a substância, pois a barreira hematoencefálica se desenvolve após 72 horas pós fertilização (hpf) nessa espécie, permitindo dano nos neurônios antes desse período (THIRUGNANAM; SANTHAKUMAR, 2022). No entanto, no *zebrafish* adulto é necessária uma injeção intracerebral e no estudo de Vijayanathan et al. (2017) a injeção contendo 25 mg/kg de 6-OHDA provocou reduções na atividade locomotora e menos neurônios dopaminérgicos no bulbo olfatório.

O paraquat é um herbicida amplamente utilizado para controlar o crescimento de gramíneas e ervas daninhas que subsequentemente se torna um contaminante aquático devido ao escoamento e má manipulação (DOYLE; CROLL, 2022). Humanos expostos a altos níveis de paraquat, geralmente durante a produção ou pelo uso como herbicida podem desenvolver sintomas parkinsonianos (DOYLE; CROLL, 2022). O paraquat age principalmente nos neurônios dopaminérgicos prejudicando o complexo mitocondrial I e seu mecanismo de ação é similar ao do MPTP e seu metabólito MPP⁺ (Wang et al., 2018). O paraquat já foi utilizado em adultos de *zebrafish* no estudo de Bortolotto et al. (2014), na qual induziram sintomas DP-like por meio de injeções intraperitoneal contendo 20 mg/kg e observaram redução na atividade locomotora, diminuição dos níveis de dopamina, problemas de memorização espacial, mas não observaram mudanças na performance social e ansiedade. Em embriões de *zebrafish* a exposição de 0,04 ppm de paraquat entre 24 até 96 hpf provocou uma redução dependente de tempo na atividade locomotora e nos níveis de serotonina e dopamina (NELLORE; NANDITA, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atuação da rotenona como substância indutora de sintomas motores e não motores da Doença de Parkinson-*like* em diferentes estágios de vida do *zebrafish* como modelo animal e propor o desenvolvimento de produtos tecnológicos para o tratamento da DP.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenvolver dispositivo para auxiliar na captação de dados comportamentais de peixes e depositar pedido de patente e de desenho industrial;
2. Avaliar e determinar concentrações de rotenona para indução de sintomas motores e não motores DP-*like* em adultos de *zebrafish* como modelo animal;
3. Analisar diferentes concentrações de rotenona em *zebrafish* nos estágios iniciais capazes de provocar alterações nos parâmetros toxicológicos e nos comportamentais como modelo animal;
4. Avaliar o tratamento do modelo *zebrafish* DP-*like* nos estágios iniciais com levodopa e com óleo essencial de *Piper nigrum* sobre parâmetros toxicológicos e comportamentais;
5. Produzir e caracterizar nanoemulsões óleo/água a partir do óleo essencial de *Piper nigrum* contendo levodopa encapsulada e depositar pedido de patente;

4 RESULTADO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DOS SINTOMAS NÃO MOTORES PARKINSON-LIKE INDUZIDOS POR ROTENONA EM ZEBRAFISH COMO MODELO ANIMAL

RESUMO

A análise de parâmetros toxicológicos e comportamentais para proposição de um modelo animal que apresente sintomas semelhantes aos da Doença de Parkinson (DP-like) foi realizada em estágios de vida iniciais de *zebrafish* expostos à rotenona. Esses parâmetros foram observados com intuito de padronizar o *zebrafish* como modelo DP-like de sintomas não-motores e propor como um método para triagem de potenciais fármacos na terapia da DP. Os parâmetros toxicológicos como taxa de epibolia, efeitos teratogênicos, mortalidade e morfometria, e os parâmetros comportamentais como tigmotaxia, sensibilidade ao toque e resposta optomotora foram analisados em *zebrafish* expostos à rotenona (5 a 20 µg/L). Aumento na mortalidade do *zebrafish* foi observado nas concentrações de 15 e 20 µg/L de rotenona. A rotenona provocou reduções nas taxas de epibolia e aumentou a presença de efeitos teratogênicos nas concentrações de 10, 15 e 20 µg/L. Reduções do tamanho da cabeça e do corpo foram observadas nas larvas em todas as concentrações de rotenona. Comportamentos semelhantes à ansiedade foram observados com diminuição da exibição do comportamento de tigmotaxia em larvas expostas a 15 e 20 µg/L, enquanto a sensibilidade ao toque apenas em 20 µg/L de rotenona. O diâmetro do olho e a resposta optomotora das larvas não foram afetados. Nossos resultados mostraram que a rotenona tem o potencial de provocar efeitos toxicológicos e sintomas não-motores, principalmente semelhantes à ansiedade, nos

estágios iniciais da vida do *zebrafish* como modelo *DP-like*, tornando-se um modelo potencial para triagem de fármacos para a terapêutica desta doença.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; Comportamentos semelhantes à ansiedade; modelo animal; rotenona; *zebrafish*.

1 INTRODUÇÃO

Entre os distúrbios neurológicos, a doença de Parkinson (DP) é o distúrbio neurodegenerativo progressivo que mais cresce em termos de prevalência e incapacidade e se tornou uma das principais causas de incapacidade em todo o mundo (DORSEY, 2018). Os sintomas mais conhecidos são distúrbios motores, porém estudos recentes sugerem que a disfunção neuronal da DP pode começar muito antes das aparentes disfunções motoras, com alterações comportamentais por meio de sintomas como ansiedade, depressão e demência (POEWE et al., 2017). Uma compreensão adequada dessas mudanças comportamentais é crucial para entender os mecanismos fisiopatológicos da DP e avaliar a eficácia e segurança de novas terapias (ASAKAWA et al., 2016). Devido a isso, é necessário a padronização de modelos animais vertebrados que possam fornecer dados sobre sintomas não-motores similares aos da DP (*DP-like*) (WANG et al., 2017).

Um modelo animal adequado para realizar esse tipo de estudo é o *zebrafish* (*Danio rerio*) em fases iniciais de vida, animal amplamente utilizado para modelos de doenças neurológicas e testes farmacológicos (BASNET et al., 2019). Entre as principais vantagens deste teleósteo estão o pequeno tamanho nas formas embrio-larval, embriões transparentes, baixo custo de manutenção, fertilização externa rápida, capacidade reprodutiva robusta e possibilidade da realização de métodos quantitativos de comportamento em larga escala (DOYLE; CROLL, 2022). Além disso, efeitos teratogênicos podem ser facilmente observados em embriões de

zebrafish expostos a substâncias químicas ou fármacos, conferindo uma excelente capacidade preditiva de toxicidade antes da avaliação em mamíferos (GAO et al., 2014). Tendo em vista as características acima mencionadas, o *zebrafish* nos estágios iniciais torna-se uma ótima ferramenta para avaliar a toxicidade em triagens de fármacos. A avaliação da toxicidade de drogas em *zebrafish* pode ser realizada pois sua atividade metabólica, farmacodinâmica e farmacocinética pode ser facilmente analisada (JAYASINGHE; JAYAWARDENA, 2019).

Além dessas características, o *zebrafish* é valioso na pesquisa de DP pois incorpora os mecanismos da neurotoxicidade de substâncias químicas indutoras de sintomas DP-like, como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), metil íon -4-fenilpiridínio (MPP+), 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), paraquat e rotenona (BRETAUD; LEE; GUO, 2004; KALYN et al., 2020). A rotenona é um pesticida derivado de uma toxina natural presente nas plantas e é utilizada na agricultura e aquicultura para eliminar peixes indesejados (DOYLE; CROLL, 2022). Tem uma natureza hidrofóbica que permite uma fácil penetração nas membranas das células neuronais (DOYLE; CROLL, 2022).

A exposição dessas substâncias em *zebrafish* é capaz de causar alterações motoras e perda de neurônios dopaminérgicos nas diferentes fases da vida do animal (KHOTIMAH et al., 2015; MELO et al., 2015; WANG et al., 2017; KALYN et al. al., 2020). No entanto, até o momento, nenhum estudo investigou a presença de sintomas não motores DP-like nos estágios iniciais da vida de *zebrafish*, tais como comportamentos semelhantes à depressão ou ansiedade (DOYLE; CROLL, 2022). Diante disso, comportamentos similares à padrões de ansiedade podem ser avaliados em larvas de *zebrafish* utilizando o teste de tigmotaxia, no qual o animal evita o centro de uma área e se move pela borda (BASNET et al., 2019). A disfunção visual é outro sintoma não motor da DP que afeta negativamente a qualidade de vida do paciente e recentemente tem sido mais amplamente estudado (WEIL et al., 2016). Por

isso, é interessante utilizar um modelo animal capaz de avaliar a acuidade visual, e o *zebrafish* possibilita isso através da análise da resposta optomotora.

Os parâmetros toxicológicos e comportamentais do *zebrafish* podem ser usados na triagem de fármacos capazes de proteger ou mitigar o surgimento de sintomas semelhantes à DP em um modelo animal. Neste estudo, concentrações de rotenona foram testadas analisando mortalidade, epibolia, efeitos teratogênicos e morfológicos para propor um modelo toxicológico para triagem de fármacos para terapia da doença de Parkinson em embriões e larvas de *zebrafish*. Adicionalmente, foi proposto a padronização da indução de sintomas não motores DP-like em larva de *zebrafish* pela análise de alterações comportamentais e visuais como uma ferramenta importante para avaliar potenciais fármacos para o tratamento da DP.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MANUTENÇÃO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal – LECA, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Os protocolos dos testes foram realizados após aprovação prévia do Comitê de Ética no Uso dos Animais (CEUA – UFRPE) com certificado número 3581030221. Os *zebrafish* adultos (*Danio rerio*, tipo selvagem de nove meses) foram criados e mantidos em $26,5 \pm 1$ °C sob um ciclo claro/escuro de 14/10h e alimentados duas vezes ao dia com ração de peixe comercial extrusada (40% proteína bruta) e artêmia salina (WESTERFIELD, 2000; OECD 236, 2013). Adultos de *zebrafish* macho:fêmea na proporção de 4:2 (WESTERFIELD, 2000) foram usados para reprodução. Os ovos foram coletados 30 minutos após a desova natural, lavados com água destilada em placas de Petri, e aqueles que não foram fertilizados, ou apresentaram irregularidades na clivagem, lesões ou outras malformações foram descartados

(WESTERFIELD, 2000; SILVA et al., 2019). Apenas os embriões com desenvolvimento normal durante o período de clivagem foram usados para formar os grupos experimentais (WESTERFIELD, 2000).

2.2 PREPARAÇÃO DA ROTENONA E EXPOSIÇÃO

A rotenona (lote # MKBZ2534V, número CAS: 83-79-4, $\geq 95\%$ de pureza) foi adquirida da Sigma (St. Louis MO, EUA) e todos os outros reagentes utilizados possuíam grau analítico. A solução estoque de rotenona foi preparada antes dos experimentos por dissolução em 0,1% (v/v) de dimetilsulfóxido (lote # 85713, Número CAS: 67-68-5, $\geq 99,9\%$ de pureza, Dinâmica, Brasil) com água destilada para obter uma concentração nominal final de 0,02 mg/mL.

Os embriões normais com 2 hpf (horas pós-fertilização) foram expostos a 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/L}$ de rotenona, denominados grupos ROT5, ROT10, ROT15 e ROT20, respectivamente. O grupo controle consistiu na exposição apenas à 0,1% (v/v) de dimetilsulfóxido (denominado grupo DMSO). Os grupos de cada tratamento tiveram seis réplicas (15 embriões por réplica). Os embriões foram incubados aleatoriamente em potes de poliestireno estéril com capacidade de 80 mL e mantidos em uma incubadora com temperatura controlada de 26 ± 1 °C e pH de $7,5 \pm 0,5$ (OECD 236, 2013; SILVA et al., 2019). Os potes contendo os *zebrafish* foram lavados todos os dias para remover córion pós-eclosão, animais mortos e repor as concentrações de rotenona.

2.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS

Para avaliar a taxa de epibolia, embriões de *zebrafish* (n = 141) com 8 hpf (após 6 h de tratamento experimental) foram fixados em paraformaldeído a 4% (PFA) em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,1 por 24 h (MARRS et al., 2010; CADENA et al., 2020b). Posteriormente, os embriões fixados foram lavados com PBS três vezes. As imagens foram capturadas usando um microscópio (modelo Bel Solaris-T) com uma câmera acoplada (modelo Bio-HDMI) para microscopia digital. As imagens foram medidas usando o software ImageJ (versão 1.53e, 2021, National Institutes of Health, MD). Para calcular a porcentagem de epibolia, a distância do polo animal ao anel germinativo (comprimento embrionário) foi dividida pela distância do polo animal do embrião ao polo vegetal (comprimento total) e multiplicada por 100 (CADENA et al., 2020b; SALES-CADENA et al., 2021).

Parâmetros de desenvolvimento de embriões e larvas (n = 450) foram avaliados diariamente entre 24-96 hpf usando um microscópio óptico com uma câmera acoplada para capturar imagens de embriões e larvas. A mortalidade foi observada diariamente com a avaliação da letalidade embrionária seguindo o protocolo OCDE 236 (2013). A metade da concentração letal máxima (CL₅₀) e a metade da concentração efetiva máxima (CE₅₀) foram calculadas a partir dos dados coletados sobre mortalidade e efeitos teratogênicos. Os efeitos teratogênicos foram analisados *in vivo*, e os parâmetros observados foram edema no pericárdio, edema do saco vitelino, coagulação, deformação da coluna vertebral, deformação da cauda, ausência de pigmentação, ausência de bexiga natatória, ausência de somitos e atraso no desenvolvimento (OECD, 2013; SILVA et al., 2019; CADENA et al., 2020a; CADENA et al., 2020b). O *zebrafish* foi considerado afetado se algum dos efeitos teratogênicos descritos acima ou mortalidade fosse observado. Todos esses parâmetros foram avaliados

qualitativamente, e os resultados foram expressos em porcentagem de animais afetados (animais com efeitos teratogênicos + animais mortos).

A morfometria das larvas (n = 374) a 144 hpf foi realizada após a eutanásia com imersão em 1200 µg/L de eugenol (STRYKOWSKI; SCHECH, 2015). Os animais foram eutanasiados após o término dos testes comportamentais e fixados em PFA 4% em PBS pH 7,1 durante a noite. As larvas foram então lavadas 3 vezes com PBS. As imagens foram capturadas e a mensuração foi feita com o software ImageJ 1.53e. Os seguintes parâmetros foram medidos: comprimento da cabeça (CC), diâmetro do olho (DO), largura da cabeça (LC) e comprimento total do corpo (CTC).

2.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

Para a avaliação dos parâmetros comportamentais, larvas com 144 hpf (n = 374) de todos os grupos foram transferidas dos respectivos potes de poliestireno para placas de 48 poços, sendo que apenas uma larva foi colocada por poço. Larvas que apresentaram efeitos teratogênicos que poderiam afetar o movimento, por exemplo, deformação da coluna e cauda, ou larvas mortas, não foram usadas nos testes comportamentais. O primeiro teste comportamental realizado foi o teste de tigmotaxia. Este teste avaliou o comportamento semelhante ao de ansiedade em *zebrafish* após mensuração da porcentagem de larvas que nadaram perto da parede dos poços (SCHNÖRR et al. 2012; CADENA et al., 2020a). Após o condicionamento dos animais de todos os grupos, as placas foram colocadas sobre uma superfície branca em ambiente iluminado. Após 10 minutos de aclimação, foi realizado o método de observação por amostragem por varredura (SILVA et al., 2019) para obter uma resposta dicotômica de cada animal: sim (para animais próximos à parede) ou não (para animais distantes da parede).

O segundo teste comportamental realizado foi o teste de sensibilidade ao toque para avaliar a resposta larval a estímulos mecânicos (CADENA et al., 2020a). Este teste foi realizado imediatamente após o teste de tigmotaxia. Usando o método de amostragem por varredura (SILVA et al., 2019), as larvas de cada poço foram tocadas na cauda. Após o toque, uma resposta dicotômica foi registrada: sim (para a larva que apresentou comportamento de fuga) ou não (para animais que não apresentaram comportamento de fuga).

O teste de resposta optomotora foi realizado ao término dos outros dois testes comportamentais e consistiu na obtenção de dados para avaliar se a acuidade visual da larva foi afetada pela rotenona (BRASTROM et al. 2019; CADENA et al., 2020a). As placas de 48 poços foram colocadas sobre uma tela horizontal na qual uma animação de 40 segundos foi reproduzida e filmada por uma câmera de smartphone com vista superior (≈ 20 cm). A animação consistiu em 5 s iniciais de branco sólido para observar a posição inicial da larva, 30 s de barras pretas e brancas alternadas da direita para a esquerda para obter uma resposta e 5 s de branco sólido para observar a posição final da larva. De acordo com a posição da larva no poço e o momento do vídeo, as respostas obtidas foram dicotômicas: larva em baixo alinhamento (quando a larva estava em uma região até 70% afastada da parede na direção do visual estímulo) ou larva em alto alinhamento (quando a larva estava em uma região até 30% próxima à parede do estímulo visual).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados nos experimentos estão apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Os dados sobre efeitos teratogênicos, morfometria, testes comportamentais de tigmotaxia e sensibilidade ao toque foram analisados por ANOVA unidirecional usando Origin Pro Academic 2015 (Origin Lab. Northampton, MA, EUA). Quando a diferença foi

significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com $p < 0,05$. Os resultados do teste de resposta optomotora foram analisados pelo teste de simetria de McNemar com $p < 0,05$. As concentrações efetivas (CL_{50} e CE_{50}) foram calculadas usando a função de decaimento alostérico não linear em uma planilha construída no Microsoft Excel.

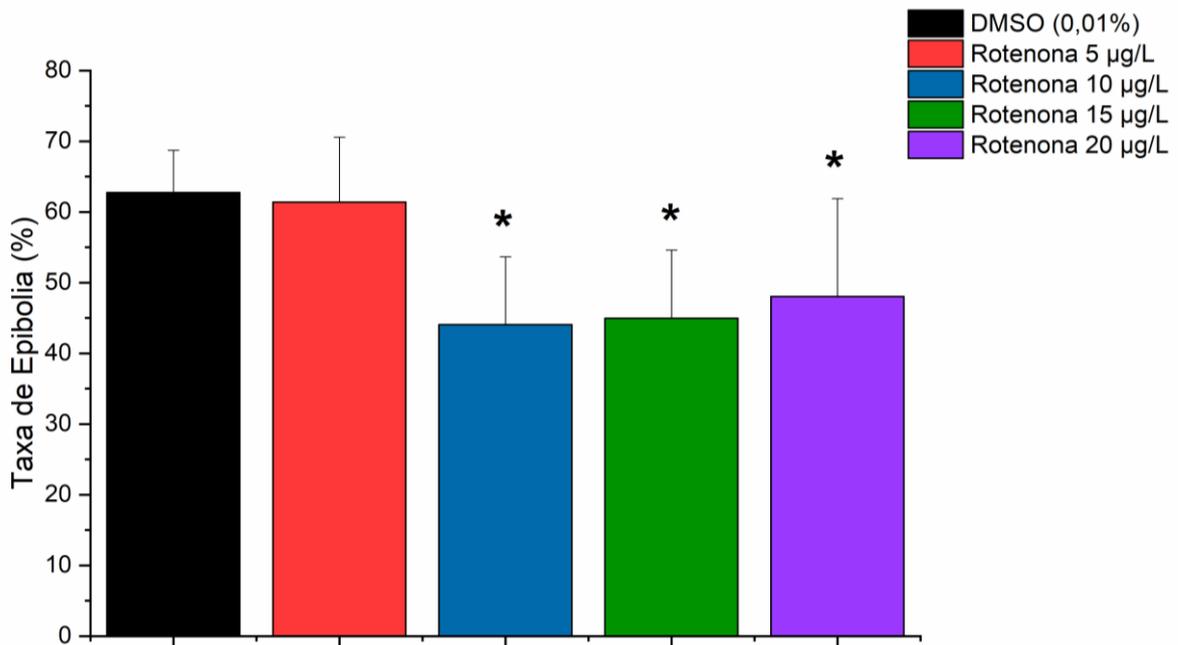
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS

A epibolia é o primeiro evento morfogenético durante o desenvolvimento do *zebrafish* e é essencial para o desenvolvimento normal (BRUCE; HEISENBERG, 2020). A exposição a diferentes concentrações de rotenona em embriões de *zebrafish* causou atrasos no desenvolvimento embrionário (Figura 1). Já no grupo DMSO foi observado um desenvolvimento normal das células vitelínicas, sem afetar a taxa de epibolia (MARRS et al., 2010; CADENA et al., 2020b). A rotenona causou alterações no progresso da epibolia em todos os grupos expostos à rotenona, exceto o grupo ROT5, indicando baixa embriotoxicidade da rotenona na concentração mais baixa. A taxa de epibolia dos grupos ROT10, ROT15 e ROT20 foi significativamente atrasada, mas não houve diferenças no progresso da epibolia entre esses grupos (Figura 1). A toxicidade da rotenona nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário observada pela avaliação da taxa de epibolia pode ser indicativa do aparecimento de efeitos teratogênicos e outros parâmetros avaliados nas fases posteriores do desenvolvimento do *zebrafish*. Na literatura, não foram encontradas avaliações da taxa de epibolia em *zebrafish* expostos a substâncias usadas em modelos DP-like. Para avaliar a suscetibilidade toxicológica de embriões de *zebrafish* à rotenona, a taxa de epibolia mostrou-se adequada para confirmar efeitos negativos no desenvolvimento embrionário em menos de

24 hpf. Além disso, a taxa de epibolia pode representar um parâmetro toxicológico que pode ser obtido rapidamente na avaliação da eficácia protetora ou tratamento no modelo DP-like em *zebrafish*.

Figura 1 – Taxa de epibolia de embriões de *zebrafish* expostos a rotenona entre 2 e 8 hpf. A taxa de epibolia foi considerada afetada quando * = $p < 0,05$. Cada grupo rotenona foi comparado com o grupo DMSO por one-way ANOVA ($F(4,141) = 23,904$ $p < 0,05$) seguido pelo teste de Tukey (ROT5 $p = 0,985$, ROT10 $p < 0,001$, ROT15 $p < 0,001$, ROT20 $p < 0,001$). Legenda dos grupos experimentais: DMSO – 0,1% (v/v) Dimetilsulfóxido; ROT5, ROT10, ROT15, e ROT20 – 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/L}$ de rotenona, respectivamente.

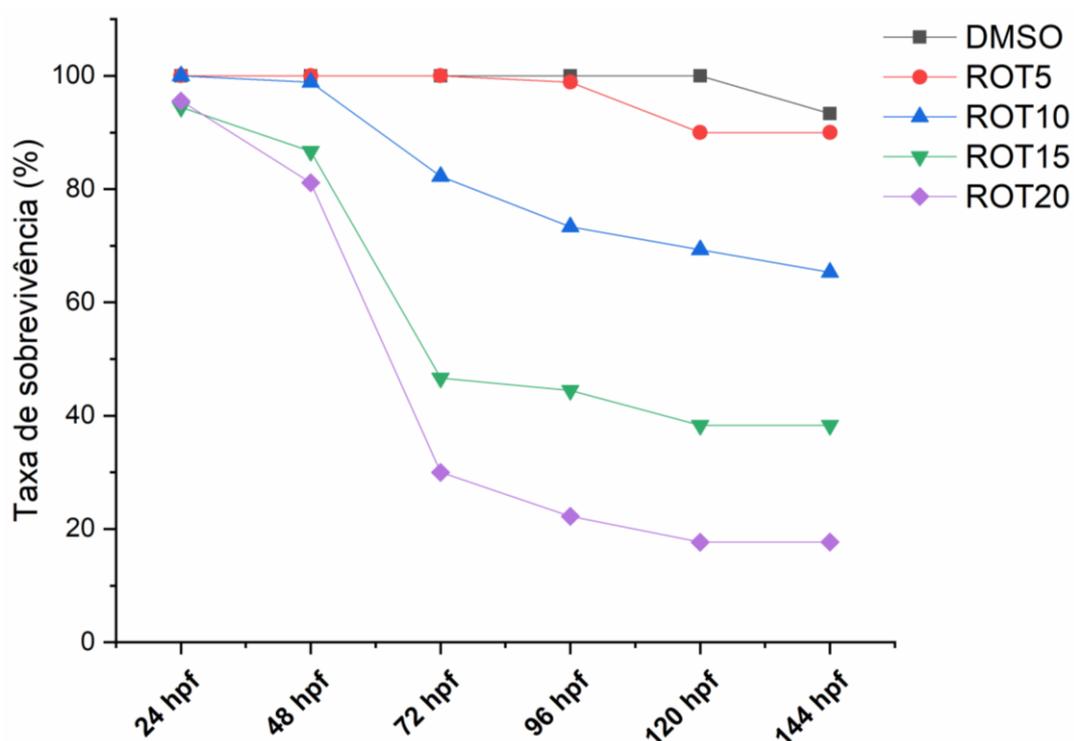


Fonte: Próprio autor (2022).

Durante todo o período entre 24-144 hpf, efeitos teratogênicos insignificantes ou taxa de sobrevivência igual ou superior a 90% (OECD 236, 2013) foram observados nos embriões do grupo DMSO (Figuras 2 e 3). O único grupo exposto à rotenona que não apresentou taxa de sobrevivência abaixo de 90% foi o ROT5, indicando baixa toxicidade da rotenona nesta concentração (Figura 2), resposta também observada na análise de epibolia. Entre 48-72 hpf, que coincide com o período de eclosão das larvas (KIMMEL et al., 1995), a mortalidade nos grupos ROT10, ROT15 e ROT20 aumentou significativamente, demonstrando que o córion atuou como barreira protetora contra a toxicidade da rotenona. Ao final de 144 hpf, apenas os

grupos ROT15 e ROT20 apresentaram uma taxa de sobrevivência abaixo de 50% (Figura 2). De acordo com os dados observados a CL_{50} da rotenona em 96 hpf foi mensurada em 13,88 $\mu\text{g/L}$.

Figura 2. Os *zebrafish* foram expostos à rotenona em 2 hpf e a mortalidade foi registrada entre 24 e 144 hpf após a exposição. Grupos experimentais: DMSO – 0,1% (v/v) Dimetilsulfóxido; ROT5, ROT10, ROT15 e ROT20 – 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/L}$ de rotenona, respectivamente.



Fonte: Próprio autor (2022).

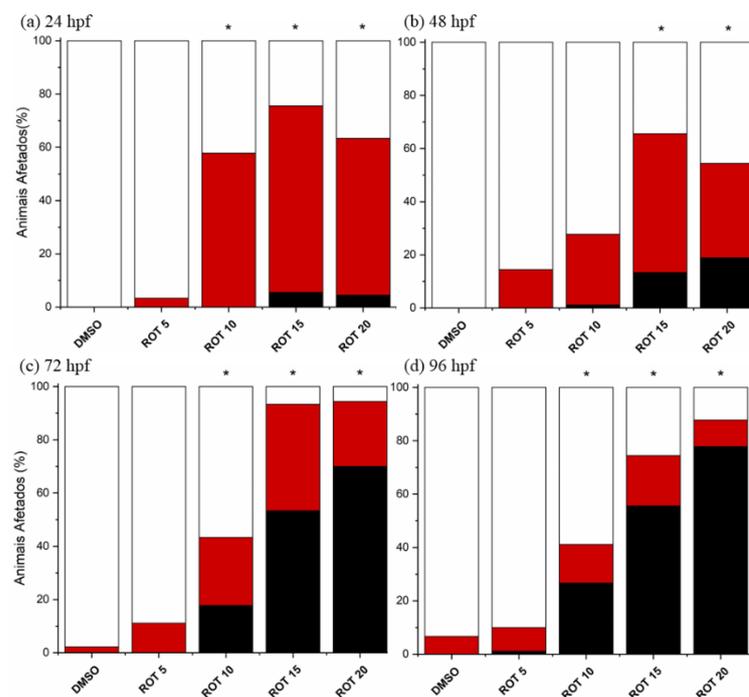
Além da taxa de mortalidade, os efeitos teratogênicos foram analisados para estimar a taxa de animais afetados expostos à rotenona. Durante os períodos de 24-48 hpf (Figura 3a-b) os principais efeitos observados nos animais afetados foram relacionados ao atraso no desenvolvimento embrionário, conforme visto na análise da epibolia. Os efeitos teratogênicos mais prevalentes em 24-48 hpf foram edema no pericárdio, ausência de pigmentação e atraso no desenvolvimento nos grupos ROT10, ROT15 e ROT20. Os grupos ROT10, ROT15 e

ROT20 apresentaram retardo na epibolia, indicando que um atraso neste estágio de desenvolvimento pode causar efeitos adversos posteriores. Este fato pode ser confirmado, pois em 24 hpf os embriões afetados dos grupos ROT10, ROT15 e ROT20 apresentaram efeitos teratogênicos de atraso no desenvolvimento, principalmente relacionados à ausência de descolamento de cauda e formação ocular incompleta, ausência de pigmentação e edema no pericárdio. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Melo et al. (2015), em que os autores observaram falta de pigmentação e atraso no desenvolvimento em embriões de 24 hpf expostos a concentrações de 10, 20, 40 e 80 µg/L de rotenona desde o início da fertilização.

Durante os períodos de 72-96 hpf (Figura 3c-d), o principal efeito observado nos animais foi a mortalidade nos grupos ROT10, ROT15 e ROT20. Mesmo com o aumento da mortalidade, ainda foram observados efeitos teratogênicos, sendo os mais prevalentes nestes dois últimos períodos foram atraso no desenvolvimento, edema no pericárdio e edema no saco vitelínico, observado nos grupos ROT10, ROT15 e ROT20. Os efeitos teratogênicos mais observados em nossos testes, o edema de pericárdio, também foi observado por Melo et al. (2015), na qual notaram o aparecimento desta má formação cardíaca apenas a partir de 72 hpf. No estudo realizado por Kalyn et al. (2020), que a exposição de *zebrafish* a uma concentração de 50 nM de rotenona iniciou-se em 72 hpf, também foi observado a presença de edema cardíaco como efeito teratogênico. No entanto, os detalhes dos mecanismos de ação da rotenona que influenciam nas malformações cardíacas permanecem desconhecidos. Segundo Melo et al. (2015), o limite entre as doses de rotenona que causam efeitos e que são ineficazes é bastante estreito, algo que também foi observado em nosso estudo. Portanto, medimos a CE₅₀ para encontrar uma concentração ideal para induzir sintomas *DP-like* em embriões de *zebrafish*, sem causar altas taxas de mortalidade, mas com possibilidade de causar vários efeitos observáveis e mensuráveis em parâmetros toxicológicos e comportamentais. Em nosso

estudo, uma CE_{50} de 11,24 $\mu\text{g/L}$ foi observada para embriões de *zebrafish* expostos à rotenona, valor similar ao observado por Melo et al. (2015) que relataram uma CE_{50} de 12,2 $\mu\text{g/L}$.

Figura 3 – Percentual de animais afetados (animais com efeitos teratogênicos + animais mortos) entre 24 e 96 hpf após exposição embrionária à rotenona. Aumentos significativos na porcentagem de animais afetados foram considerados quando * = $p < 0,05$. Os grupos experimentais em (a) 24 hpf foram comparados ao grupo DMSO por one-way ANOVA ($F(4,29) = 7,867$ $p < 0,05$) seguido pelo teste de Tukey (ROT5 $p = 0,999$, ROT10 $p = 0,026$, ROT15 $p = 0,002$, ROT20 $p = 0,012$). Os grupos experimentais em (b) 48 hpf foram comparados ao grupo DMSO por one-way ANOVA ($F(4,29) = 5,378$ $p < 0,05$) seguido pelo teste de Tukey (ROT5 $p = 0,905$, ROT10 $p = 0,469$, ROT15 $p = 0,004$, ROT20 $p = 0,023$). Os grupos experimentais em (c) 72 hpf foram comparados ao grupo DMSO por one-way ANOVA ($F(4,29) = 84,226$ $p < 0,05$) seguido pelo teste de Tukey (ROT5 $p = 0,684$, ROT10 $p < 0,001$, ROT15 $p < 0,001$, ROT20 $p < 0,001$). Os grupos experimentais em (d) 96 hpf foram comparados ao grupo DMSO por one-way ANOVA ($F(4,29) = 32,095$ $p < 0,05$) seguido pelo teste de Tukey (ROT5 $p = 0,996$, ROT10 $p = 0,007$, ROT15 $p < 0,001$, ROT20 $p < 0,001$). Legenda: DMSO – 0,1% (v/v) Dimetilsulfóxido; ROT5, ROT10, ROT15 e ROT20 – 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/L}$ de rotenona, respectivamente.



Fonte: Próprio autor (2022).

Alterações morfométricas no comprimento da cabeça, largura da cabeça e comprimento do corpo foram observadas em larvas de *zebrafish* em 144 hpf em todos os grupos expostos à rotenona (Tabela 1). Em relação ao diâmetro do olho, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos expostos à rotenona e o grupo DMSO. Os

únicos parâmetros alterados no grupo exposto à menor concentração de rotenona (ROT5) entre todas as análises realizadas foram a redução significativa no comprimento da cabeça, largura da cabeça e comprimento do corpo. As alterações morfométricas observadas no grupo ROT5 indicam que mesmo em baixas concentrações, a rotenona foi capaz de influenciar negativamente o desenvolvimento dos animais testados, embora não tenham sido observadas alterações significativas nos demais parâmetros avaliados no grupo ROT5 (Tabela 2). Esse fato pode estar associado à alta sensibilidade dos tecidos ósseos à rotenona, conforme relatado por Heinz et al. (2017) ao observar a depleção da medula óssea e atrofia óssea em ratos de 7-8 semanas expostos à rotenona. Em geral, houve uma redução significativa no tamanho da cabeça das larvas expostas à rotenona, provavelmente causada pela capacidade da rotenona em diminuir a ossificação.

Tabela 1 – Medidas morfométricas de larvas de *zebrafish* expostas à rotenona em 144 hpf.

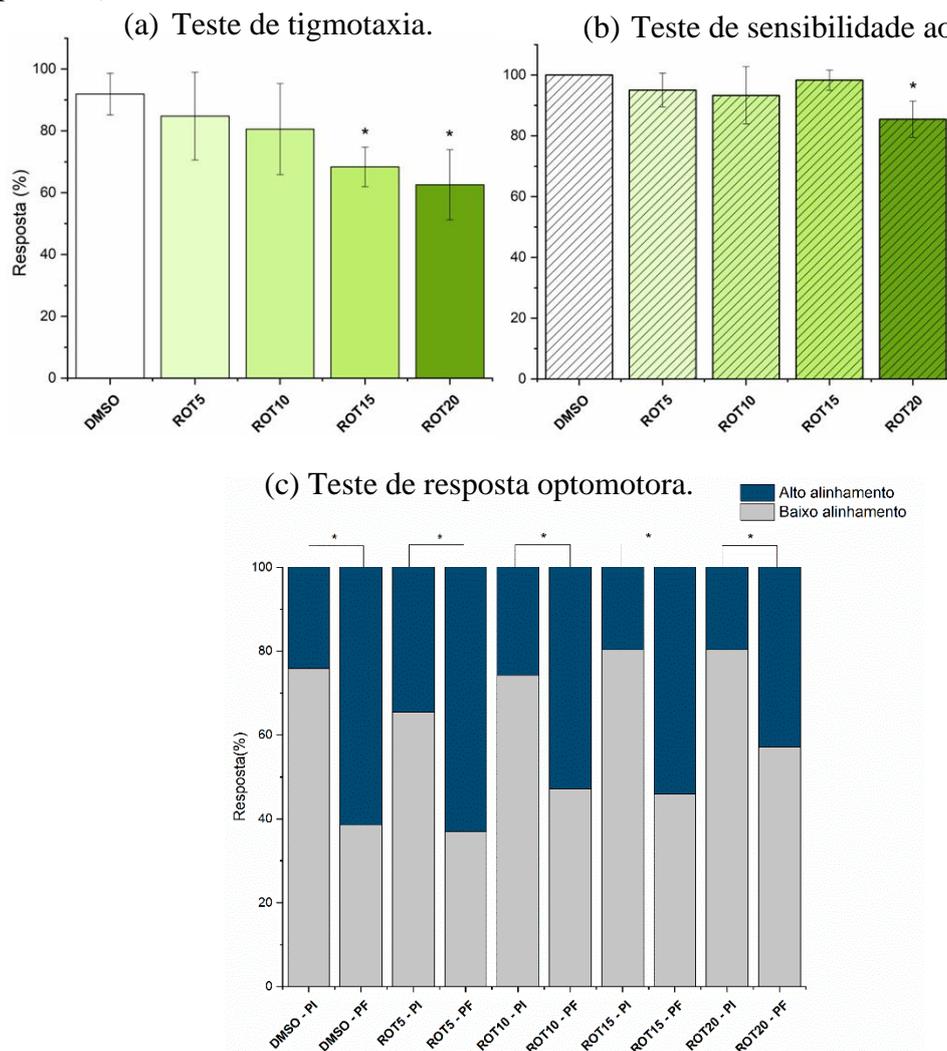
	<i>Comprimento da cabeça (mm)</i>	<i>Largura da cabeça (mm)</i>	<i>Diâmetro do olho (mm)</i>	<i>Comprimento do corpo (mm)</i>
DMSO	0,803 ± 0,050	0,546 ± 0,041	0,358 ± 0,022	3,704 ± 0,203
ROT5	0,755 ± 0,060*	0,514 ± 0,041*	0,361 ± 0,159	3,560 ± 0,101*
ROT10	0,770 ± 0,050*	0,528 ± 0,033*	0,342 ± 0,021	3,631 ± 0,181*
ROT15	0,775 ± 0,030*	0,526 ± 0,029*	0,343 ± 0,016	3,538 ± 0,147*
ROT20	0,764 ± 0,029*	0,509 ± 0,025*	0,349 ± 0,014	3,525 ± 0,128*

Os dados estão expressos como média ± Desvio Padrão. * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo DMSO. Para o comprimento da cabeça, cada grupo experimental foi comparado com o grupo DMSO por one-way ANOVA ($F(4,374) = 13,772$ $p < 0,05$) seguido pelo teste de Tukey (ROT5 $p = 0$, ROT10 $p < 0,001$, ROT15 $p = 0,018$, ROT20 $p < 0,001$). Para a largura da cabeça, cada grupo experimental foi comparado com o grupo DMSO por one-way ANOVA ($F(4,374) = 12,638$ $p < 0,05$) seguido pelo teste de Tukey (ROT5 $p < 0,001$, ROT10 $p = 0,013$, ROT15 $p = 0,045$, ROT20 $p < 0,001$). Para o diâmetro do olho, cada grupo experimental foi comparado com o grupo DMSO por one-way ANOVA ($F(4,374) = 0,881$ $p < 0,05$) seguido pelo teste de Tukey (ROT5 $p = 0,999$, ROT10 $p = 0,632$, ROT15 $p = 0,881$, ROT20 $p = 0,925$). Para o comprimento do corpo, cada grupo experimental foi comparado com o grupo DMSO por one-way ANOVA ($F(4,374) = 17,174$ $p < 0,05$) seguido pelo teste de Tukey (ROT5 $p < 0,001$, ROT10 $p = 0,032$, ROT15 $p < 0,001$, ROT20 $p < 0,001$). Legenda: DMSO – 0,1% (v/v) Dimetilsulfóxido; ROT5, ROT10, ROT15 e ROT20 – 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/L}$ de rotenona, respectivamente. Fonte: Próprio autor (2022).

3.2 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

Os testes de tigmotaxia e de sensibilidade demonstraram mudanças no comportamento devido à exposição à rotenona em larvas de *zebrafish* em 144 hpf. A tigmotaxia é um comportamento específico relacionado à ansiedade e representa um dos parâmetros comportamentais mais utilizados em estudos pré-clínicos empregando modelos de roedores, nos quais os animais são colocados em um ambiente novo e, por padrão, evitam fortemente o centro desse ambiente ao tentar se aproximar para as bordas (SCHNÖRR et al. 2012). Nesse teste foi observado que as larvas do grupo DMSO se moverem próximas à parede dos poços, como esperado em larvas saudáveis, com menos de 10% dos animais afastados da parede do poço durante os testes (Figura 4a). Durante o teste tigmotaxia foi observado que a rotenona causou alterações comportamentais significativas (Figura 4a) nos grupos com as duas maiores concentrações de rotenona (ROT15 e ROT20). Esse resultado pode indicar que a rotenona pode alterar a atividade neuronal, causando alterações no comportamento do tipo ansiedade. Estudos anteriores que expuseram embriões e larvas de *zebrafish* a substâncias que provocam DP-like não analisaram comportamentos semelhantes à ansiedade, um sintoma não motor da DP. O estudo de Wang et al., (2017), avaliou comportamentos do tipo ansiedade no modelo DP-like de *zebrafish* adulto exposto à rotenona usando um teste de preferência claro/escuro para observar se a rotenona causava mudanças no comportamento. Os autores concluíram que os sintomas comportamentais estavam associados à diminuição dos níveis de dopamina no cérebro dos peixes tratados com rotenona, algo que também pode ter ocorrido nas larvas do nosso experimento. A partir da observação desses resultados, pode-se considerar a utilização larvas de *zebrafish* expostas à rotenona como um modelo de indução de sintomas não motores DP-like.

Figura 4 – Larvas de *zebrafish* expostas a altas concentrações de rotenona mostraram reduções na exibição de tigmotaxia e na sensibilidade ao toque. (a) O teste de tigmotaxia avalia comportamentos de ansiedade em larvas de *zebrafish*. A porcentagem da resposta de cada grupo foi comparada com o grupo DMSO por one-way ANOVA ($F(4,34) = 6,165$ $p < 0,05$) seguido pelo teste de Tukey (ROT5 $p = 0,669$, ROT10 $p = 0,261$, ROT15 $p = 0,013$, ROT20 $p = 0,001$); (b) O teste de sensibilidade ao toque avalia a resposta larval à estímulos mecânicos. A porcentagem da resposta de cada grupo foi comparada com o grupo DMSO por one-way ANOVA ($F(4,12) = 4,366$ $p < 0,05$) seguido pelo teste de Tukey (ROT5 $p = 0,633$, ROT10 $p = 0,414$, ROT15 $p = 0,991$, ROT20 $p = 0,009$). Legenda: DMSO – 0,1% (v/v) Dimetilsulfóxido; ROT5, ROT10, ROT15 e ROT20 – 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/L}$ de rotenona, respectivamente. (c) A resposta optomotora de *zebrafish* como porcentagens total e comparada pelo teste de simetria de McNemar no mesmo grupo entre a posição inicial (PI) e posição final (PF) * = $p < 0,05$. Posição inicial contra a posição final: DMSO $p < 0,001$; ROT5 $p < 0,001$; ROT10 $p < 0,001$; ROT15 $p < 0,001$; ROT20 $p < 0,001$).



Fonte: Próprio autor (2022).

Nos resultados do teste de sensibilidade ao toque, que verifica a capacidade de resposta ao toque e a exibição do comportamento de fuga, as larvas apresentaram reduções significativas na resposta de sensibilidade apenas no grupo ROT20 (Figura 4b). A redução da sensibilidade pode estar relacionada à ação neurotóxica da rotenona, que interfere no estado normal do sistema nervoso central e pode indicar um leve defeito de locomoção (KALYN et al., 2020). Diante dos resultados dos testes de tigmotaxia e sensibilidade ao toque, foram observados defeitos comportamentais em larvas expostas às maiores concentrações de rotenona, mesmo em animais que não apresentaram efeitos teratogênicos aparentes.

Por meio dos dados obtidos pelo teste de resposta optomotora não foram observadas alterações na acuidade visual e resposta motora das larvas. Apesar da rotenona já ser utilizada como uma substância química causadora de degeneração da retina em ratos (SASAOKA et al., 2020), não foram encontrados na literatura estudos avaliando a resposta optomotora em *zebrafish* expostos à essa substância. No entanto, no estudo de Bevenutti et al. (2018), que expôs larvas de *zebrafish* ao 6-OHDA, foi observado alterações na resposta optomotora em larvas de *zebrafish* com 7 dpf e ainda causaram um comprometimento sensorial. Em nosso estudo, as larvas de todos os grupos expostos à rotenona responderam positivamente ao estímulo visual induzido. Isto indica que as concentrações de rotenona não foram suficientes para afetar a locomoção e a capacidade visual dos animais neste teste, mesmo em os grupos que apresentaram alterações nos testes de tigmotaxia e de sensibilidade ao toque.

Os efeitos negativos da rotenona nos estágios iniciais da vida de *zebrafish* como modelo para estudar os sintomas DP-like foram observados diferentemente de acordo com a concentração de rotenona usada. A menor concentração utilizada (ROT5), por exemplo, causou apenas uma alteração observada no parâmetro toxicológico, que foi a diminuição do tamanho da cabeça e do corpo, mas efeitos em sintomas comportamentais não foram observados. A exposição à rotenona no grupo ROT10 não causou alterações

comportamentais, embora tenham sido observados efeitos toxicológicos, como na taxa de epibolia, defeitos teratogênicos e reduções morfométricas. Desta forma, a exposição com 10 µg/L de rotenona não é indicada para induzir alterações comportamentais neste modelo animal. No entanto, os 10 µg/L de rotenona podem ser usados para provocar efeitos toxicológicos em modelo animal de *zebrafish* para triagem de fármacos contra a DP. As concentrações de 15 e 20 µg/L de rotenona (ROT15 e ROT20, respectivamente) em *zebrafish* provocaram efeitos significativos em todos os parâmetros toxicológicos analisados. Em relação aos parâmetros comportamentais avaliados, o grupo ROT15 apresentou redução na tigmotaxia, enquanto larvas do grupo ROT20, além de apresentarem redução na tigmotaxia, também apresentaram redução na sensibilidade ao toque. No entanto, a alta taxa de mortalidade observada nesses dois grupos pode dificultar a realização de testes e reduzir a sobrevivência dos animais para a testagem de candidatos à fármacos. Diante do exposto, recomenda-se a utilização de uma concentração entre 10 e 15 µg/L (Tabela 2), na qual a mortalidade é reduzida, mas há efeitos toxicológicos e comportamentais observáveis e significativos. Esse modelo animal com as concentrações de rotenona sugeridas possuem potencial para avaliação de possíveis novos medicamentos para o tratamento da DP.

Tabela 2 – Resumo dos efeitos observados causados por diferentes concentrações de rotenona nos parâmetros avaliados no modelo de *zebrafish* DP-like.

	Parâmetros Toxicológicos						Parâmetros Comportamentais		
	Desenvolvimento		Animais Afetados		Medidas morfológicas		Testes Comportamentais		
	Taxa de Epibolia	Teratogênicos	Mortalidade	Cabeça	Olho	Corpo	Tigmotaxia	Sensibilidade	Optomotor
DMSO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
ROT5	NO	NO	NO	+	NO	+	NO	NO	NO
ROT10	+	+	NO	+	NO	+	NO	NO	NO
ROT15	+	+	+	+	NO	+	+	NO	NO
ROT20	+	+	+	+	NO	+	+	+	NO

+ = positivo; NO = Não observável. Legendas: DMSO – 0,1% (v/v) Dimetilsulfóxido; ROT5, ROT10, ROT15 e ROT20 – 5, 10, 15 e 20 µg/L de rotenona, respectivamente. Fonte: Próprio autor (2022).

4 CONCLUSÃO

Em conclusão, o uso dos estágios iniciais da vida de *zebrafish* exposto à rotenona em nosso trabalho mostrou-se adequado como modelo animal para estudos de DP-like. A rotenona foi capaz de induzir efeitos tóxicos em parâmetros embrionários, de desenvolvimento e morfológicos, afetando também parâmetros comportamentais como a presença de padrões ansiedade-like que mimetizam sintomas não motores da DP. Concentrações entre 10 e 15 µg/L de rotenona são recomendadas para a observação de efeitos no desenvolvimento e mudanças comportamentais porque a rotenona foi tóxica para o *zebrafish* no estágio embrio-larval e aumentos na concentração podem causar alta mortalidade aumentada. Este modelo animal DP-like pode ser usado para rastrear e investigar potenciais fármacos para a terapêutica da DP.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASAKAWA, T. et al. Animal behavioral assessments in current research of Parkinson's disease. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 65, p. 63–94, 2016.

BASNET, R. et al. Zebrafish Larvae as a Behavioral Model in Neuropharmacology. **Biomedicines**, v. 7, n. 1, p. 23, 2019.

BENVENUTTI, R. et al. N-acetylcysteine protects against motor, optomotor and morphological deficits induced by 6-OHDA in zebrafish larvae. **PeerJ**, v. 2018, n. 6, 2018.

BRASTROM, L. K. et al. A High-Throughput Assay for Congenital and Age-Related Eye Diseases in Zebrafish. **Biomedicines**, v. 7, n. 2, p. 28, 2019.

BRETAUD, S.; LEE, S.; GUO, S. Sensitivity of zebrafish to environmental toxins implicated in Parkinson's disease. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 26, n. 6, p. 857–864, 2004.

CADENA, P. G. et al. Folic acid reduces the ethanol-induced morphological and behavioral defects in embryonic and larval zebrafish (*Danio rerio*) as a model for fetal alcohol spectrum disorder (FASD). **Reproductive Toxicology**, v. 96, p. 249–257, 2020a.

CADENA, P. G. et al. Protective effects of quercetin, polydatin, and folic acid and their mixtures in a zebrafish (*Danio rerio*) fetal alcohol spectrum disorder model. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 82, 2020b.

DOYLE, J. M.; CROLL, R. P. A Critical Review of Zebrafish Models of Parkinson's Disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 2022.

GAO, X.-P. et al. Toxicity Assessment of 7 Anticancer Compounds in Zebrafish. **International Journal of Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 98–105, 2014.

HEINZ, S. et al. Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

JAYASINGHE, C. D.; JAYAWARDENA, U. A. Toxicity Assessment of Herbal Medicine Using Zebrafish Embryos: A Systematic Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, p. 1–17, 2019.

KALYN, M. et al. Comprehensive analysis of neurotoxin-induced ablation of dopaminergic neurons in Zebrafish Larvae. **Biomedicines**, v. 8, n. 1, 2020.

KHOTIMAH, H. et al. Decreasing α -synuclein aggregation by methanolic extract of *Centella asiatica* in zebrafish Parkinson's model. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 11, p. 948–954, 2015.

KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253–310, 1995.

MARRS, J. A. et al. Zebrafish fetal alcohol syndrome model: effects of ethanol are rescued by retinoic acid supplement. **Alcohol**, v. 44, n. 7–8, p. 707–715, 2010.

MELO, K. M. et al. Short-term exposure to low doses of rotenone induces developmental, biochemical, behavioral, and histological changes in fish. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 18, p. 13926–13938, 2015.

OECD, 2013. Education at a Glance 2013: OECD Indicators. OECD Publishing.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1–21, 2017.

DORSEY, E. et al. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 11, p. 939–953, 2018.

SALES CADENA, M. R. et al. Zebrafish (*Danio rerio*) larvae show behavioral and embryonic development defects when exposed to opioids at embryo stage. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 85, 2021.

SASAOKA, M.; OTA, T.; KAGEYAMA, M. Rotenone-induced inner retinal degeneration via presynaptic activation of voltage-dependent sodium and L-type calcium channels in rats. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 969, 2020.

SCHNÖRR, S. J. et al. Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 228, n. 2, p. 367–374, 2012.

SILVA, M. C. G. DA et al. The complexation of steroid hormones into cyclodextrin alters the toxic effects on the biological parameters of zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 214, p. 330–340, 2019.

Strykowski, J.L., Schech J. M., Effectiveness of recommended euthanasia methods in larval zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 54, p. 81-84, 2015.

WANG, Y. et al. Parkinson's disease-like motor and non-motor symptoms in rotenone-treated zebrafish. **NeuroToxicology**, v. 58, p. 103–109, 2017.

WEIL, R. S. et al. Visual dysfunction in Parkinson's disease. **Brain**, v. 139, n. 11, p. 2827–2843, 2016.

Westerfield, M., The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 4th ed. University of Oregon Press, Eugene, OR, 2000.

5 CONCLUSÕES

- O dispositivo desenvolvido permitiu a captação de múltiplos vídeos simultâneos de forma padronizada para a avaliação dos parâmetros motores e não motores de *zebrafish* DP-like, tornando-se uma patente de invenção e um registro de desenho industrial;
- As concentrações de rotenona utilizadas foram capazes de produzir efeitos negativos quantificáveis na atividade locomotora do *zebrafish* adulto causando sintomas motores DP-like. O modelo apresentado em nosso estudo pode possibilitar a triagem de candidatos a fármacos e com possível uso na identificação de novas estratégias terapêuticas da DP;
- O uso do *zebrafish* em estágios iniciais de vida exposto a concentrações de rotenona mostrou-se adequado como modelo animal DP-like, pois a rotenona induziu alterações nos parâmetros toxicológicos e provocou mudanças comportamentais semelhantes à sintomas não motores DP-like;
- O tratamento com levodopa e o óleo essencial de *Piper nigrum* em estágios iniciais de vida do *zebrafish* DP-like reduziram os efeitos tóxicos da rotenona, como mortalidade, taxa de eclosão e efeitos teratogênicos e o tratamento do modelo *zebrafish* DP-like com o óleo essencial de *Piper nigrum* protegeu as larvas das alterações da resposta optomotora;
- A nanoemulsão produzida obteve vesículas estáveis com o óleo essencial rico em terpenos de tamanho inferior a 200 nm com possibilidade de incorporação em formas farmacêuticas comerciais e utilizada no tratamento de doenças neurodegenerativas, após análises pré-clínicas e clínicas;

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, A. Levodopa: the story so far. **Nature**, v. 466, n. 7310, p. S6–S7, 2010.
- ABOOFAZELI, R. Nanometric-scaled emulsions (nanoemulsions). **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 4, p. 325–326, 2010.
- AHLSSKOG, J. E. Aerobic Exercise: Evidence for a Direct Brain Effect to Slow Parkinson Disease Progression. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 93, n. 3, p. 360–372, 2018.
- AHMAD, F.; RICHARDSON, M. K. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: Impact of environmental complexity. **Behavioural Processes**, v. 92, p. 88–98, 2013.
- ALBIN, R. L.; YOUNG, A. B.; PENNEY, J. B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. **Trends in Neurosciences**, v. 12, n. 10, p. 366–75, 1989.
- ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 978–985, 2011.
- ARMSTRONG, M. J.; OKUN, M. S. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease. **JAMA**, v. 323, n. 6, p. 548, 2020.
- ASHOKKUMAR, K. *et al.* Phytochemistry and therapeutic potential of black pepper [*Piper nigrum* (L.)] essential oil and piperine: a review. **Clinical Phytoscience**, v. 7, n. 1, 2021.
- BALESTRINO, R.; SCHAPIRA, A. H. V. Parkinson disease. **European Journal of Neurology**, v. 27, n. 1, p. 27–42, 2020.
- BANDIWADEKAR, A. *et al.* Emerging Novel Approaches for the Enhanced Delivery of Natural Products for the Management of Neurodegenerative Diseases. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 72, n. 3, p. 653–676, 2022.
- BASMA, A. N. *et al.* Cytotoxicity to PC 12 Cells Culture. **Journal of Neurochemistry**, v. 64, n. 2, p. 825–832, 1995.
- BASNET, R. *et al.* Zebrafish Larvae as a Behavioral Model in Neuropharmacology. **Biomedicines**, v. 7, n. 1, p. 23, 2019.
- BASSANI, T. B.; VITAL, M. A. B. F.; RAUH, L. K. Neuroinflammation in the pathophysiology of Parkinson's disease and therapeutic evidence of anti-inflammatory drugs. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 73, n. 7, p. 616–623, 2015.
- BELLOU, V. *et al.* Environmental risk factors and Parkinson's disease: An umbrella review of meta-analyses. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 23, n. 2015, p. 1–9, 2016.
- BENCAN, Z.; SLEDGE, D.; LEVIN, E. D. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 94, n. 1, p. 75–80, 2009.

BETARBET, R. *et al.* Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 1301–1306, 2000.

BISBAL, M.; SANCHEZ, M. Neurotoxicity of the pesticide rotenone on neuronal polarization: a mechanistic approach. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 5, p. 762, 2019

BORTOLOTTO, J. W. *et al.* Long-term exposure to paraquat alters behavioral parameters and dopamine levels in adult zebrafish (*Danio Rerio*). **Zebrafish**, v. 11, n. 2, p. 142–153, 2014.

BOVOLENTA, T. *et al.* Average annual cost of Parkinson's disease in São Paulo, Brazil, with a focus on disease-related motor symptoms. **Clinical Interventions in Aging**, v. 12, p. 2095–2108, 2017.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K. Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. **Neurology**, v. 70, n. 20, p. 1916–1925, 2008.

CADENA, P. G. *et al.* Folic acid reduces the ethanol-induced morphological and behavioral defects in embryonic and larval zebrafish (*Danio rerio*) as a model for fetal alcohol spectrum disorder (FASD). **Reproductive Toxicology**, v. 96, p. 249–257, 2020.

CANNON, J. R. *et al.* A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 34, n. 2, p. 279–290, 2009.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, n. 2–3, p. 125–155, 2004.

CARAMILLO, E. M.; ECHEVARRIA, D. J. Alzheimer's disease in the zebrafish: Where can we take it? **Behavioural Pharmacology**, v. 28, n. 2- 3 Special Issue, p. 179–186, 2017.

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. **Nature**, v. 180, n. 4596, p. 1200–1200, 1957.

CEDARBAUM, J. M. Clinical Pharmacokinetics of Anti-Parkinsonian Drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 13, n. 3, p. 141-178, 1987.

CHAMPAGNE, D. L. *et al.* Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): Relevance for stress research. **Behavioural Brain Research**, v. 214, n. 2, p. 332–342, 2010.

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. 275–83, 2005.

CHIES, C. E. *et al.* Antioxidant effect of *Lippia alba* (Miller) N. E. brown. **Antioxidants**, v. 2, n. 4, p. 194–205, 2013.

COTZIAS, G. C.; VAN WOERT, M. H.; SCHIFFER, L. M. Aromatic Amino Acids and Modification of Parkinsonism. **New England Journal of Medicine**, v. 276, n. 7, p. 374–379, 1967.

DA COSTA, I. M. et al. Supplementation with Herbal Extracts to Promote Behavioral and Neuroprotective Effects in Experimental Models of Parkinson's Disease: A Systematic Review. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 7, p. 959–970, 2017.

DATLA, K. P.; BLUNT, S. B.; DEXTER, D. T. Chronic L-DOPA Administration is not Toxic to the Remaining Dopaminergic Nigrostriatal Neurons, but Instead May Promote Their Functional Recovery, in Rats With Partial 6-OHDA or FeCl₃ Nigrostriatal Lesions. **Movement Disorders**, v. 16, n. 3, p. 424-434, 2001.

DE LAU, L. M.; BRETELER, M. M. Epidemiology of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v. 5, n. 6, p. 525–535, 2006.

DENG, H.; WANG, P.; JANKOVIC, J. S.C. The genetics of Parkinson disease. **Ageing Research Reviews**, v. 42, p. 72-85, 2018.

DICKSON, D. W. Neuropathology of Parkinson disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 46, p. S30–S33, 2018.

DORSEY, E. et al. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 11, p. 939–953, 2018.

DORSEY, E. R. et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**, v. 68, n. 5, p. 384–386, 2007.

DOWDING, C. H.; SHENTON, C. L.; SALEK, S. S. A review of the health-related quality of life and economic impact of Parkinson's disease. **Drugs Aging**, v. 23, n. 9, p. 693-721, 2006.

DOYLE, J. M.; CROLL, R. P. A Critical Review of Zebrafish Models of Parkinson's Disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 2022.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

EHRINGER, H.; HORNYKIEWICZ, O. Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 4, n. 2, p. 53-57, 1998.

ENGESZER, R. E. et al. Zebrafish in the wild: A review of natural history and new notes from the field. **Zebrafish**, v. 4, n. 1, p. 21–40, 2007.

FERNANDEZ, P. et al. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, n. 1–3, p. 53–58, 2004.

FONSEKA, T. M. et al. Zebrafish models of major depressive disorders. **Journal of Neuroscience Research**, v. 94, n. 1, p. 3–14, 2016.

FORGIARIN, A., et al. Formation and stability of nano-emulsions in mixed nonionic surfactant systems. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 118, p. 184-189, 2001.

FORRESTER, L. T. *et al.* Aromatherapy for dementia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2014, n. 2, 2014.

FRYD, M. M.; MASON, T. G. Advanced Nanoemulsions. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 493–518, 2012.

GABA, B. *et al.* Vitamin E Loaded Naringenin Nanoemulsion via Intranasal Delivery for the Management of Oxidative Stress in a 6-OHDA Parkinson's Disease Model. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 2382563, 2019.

GAO, G. *et al.* Gold nanoclusters for Parkinson's disease treatment. **Biomaterials**, v. 194, p. 36-46, 2019.

GONZALEZ-LATAPI, P. *et al.* Non-Dopaminergic Treatments for Motor Control in Parkinson's Disease: An Update. **CNS Drugs**, v. 34, n. 10, p. 1025–1044, 2020.

GRUNWALD, D. J.; EISEN, J. S. Headwaters of the zebrafish — emergence of a new model vertebrate. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 9, p. 717–724, 2002.

GUO, S. *et al.* Protective Effects of Green Tea Polyphenols in the 6-OHDA Rat Model of Parkinson's Disease Through Inhibition of ROS-NO Pathway. **Biological Psychiatry**, v. 62, n. 12, p. 1353–1362, 2007.

GUPTA, A. *et al.* Nanoemulsions: formation, properties, and applications. **Soft Matter**, v. 12, n. 11, p. 2826-2841, 2016.

GUSTAVSSON, A. *et al.* Cost of disorders of the brain in Europe 2010. **European Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 10, p. 718–779, 2011.

HAGHANI, S. *et al.* An Automated Assay System to Study Novel Tank Induced Anxiety. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 13, 2019.

HARWANSH, R. K.; DESHMUKH, R.; RAHMAN, M. A. Nanoemulsion: Promising nanocarrier system for delivery of herbal bioactives. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 51, p. 224–233, 2019.

HAUSER, R. A. Levodopa: Past, present, and future. **European Neurology**, v. 62, n. 1, p. 1-8, 2009.

HERNANDEZ-BALTAZAR, D. *et al.* Animal Model of Parkinson Disease: Neuroinflammation and Apoptosis in the 6-Hydroxydopamine-Induced Model. *In: Experimental Animal Models of Human Diseases - An Effective Therapeutic Strategy*. London: IntechOpen; 2018.

HORNYKIEWICZ, O. A brief history of levodopa. **Journal of Neurology**, v. 257, n. Suppl 2, p. S249-252, 2010.

HOWE, K. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.

- INNOS, J.; HICKEY, M. A. Using Rotenone to Model Parkinson's Disease in Mice: A Review of the Role of Pharmacokinetics. **Chemical Research in Toxicology**, v. 34, n. 5, p. 1223–1239, 2021.
- IZQUIERDO, P. et al. Formation and stability of nano-emulsions prepared using the phase inversion temperature method. **Langmuir**, v. 18, n. 1, p. 26–30, 2002.
- JAGTAP, A.; MAKHIJA, D. Studies on sensitivity of zebrafish as a model organism for Parkinson's disease: Comparison with rat model. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 5, n. 1, p. 39, 2014.
- JANKOVIC, J. Levodopa strengths and weaknesses. **Neurology**, v. 58, n. Supplement 1, p. S19–S32, 2002.
- JUCKER, M. The benefits and limitations of animal models for translational research in neurodegenerative diseases. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1210–1214, 2010.
- KADAPPAN, A. S. et al. The Efficacy of Nanoemulsion-Based Delivery to Improve Vitamin D Absorption: Comparison of *In Vitro* and *In Vivo* Studies. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 62, n. 4, p. 1700836, 2018.
- KALYN, M. *et al.* Comprehensive analysis of neurotoxin-induced ablation of dopaminergic neurons in Zebrafish Larvae. **Biomedicines**, v. 8, n. 1, 2020.
- KARAMI, Z. et al. Nanoemulsions in CNS drug delivery: recent developments, impacts and challenges. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 5, p. 1104–1115, 2019.
- KHOTIMAH, H. et al. Decreasing α -synuclein aggregation by methanolic extract of *Centella asiatica* in zebrafish Parkinson's model. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 11, p. 948–954, 2015.
- KOWAL, S. L. et al. The current and projected economic burden of Parkinson's disease in the United States. **Movement Disorders**, v. 28, n. 3, p. 311–318, 2013.
- LANGSTON, J. W. The MPTP Story. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 7, n. s1, p. S11–S19, 2017.
- LARIJANI, B. *et al.* The Design and Application of an Appropriate Parkinson's Disease Animal Model in Regenerative Medicine. *In: Advances in Experimental Medicine and Biology*. v. 1341, p. 89-105, 2019.
- LEE, T. K.; YANKEE, E. L. Review Open Access Neuroimmunology and Neuroinflammation A review on Parkinson's disease treatment. **Neuroimmunol Neuroinflammation**, v. 8, 2021.
- LI, X. et al. Protective effects of baicalein against rotenone-induced neurotoxicity in PC12 cells and isolated rat brain mitochondria. **European Journal of Pharmacology**, v. 674, n. 2–3, p. 227–233, 2012.
- LIAO, Y. et al. Comparison of surfactants at solubilizing, forming and stabilizing nanoemulsion of hesperidin. **Journal of Food Engineering**, v. 281, p. 110000, 2020.

LIU, L. et al. Relative developmental toxicity of short-chain chlorinated paraffins in Zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Environmental Pollution**, v. 219, p. 1122-1130, 2016.

LOVELYN, C.; ATTAMA, A. A. Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 5, p. 626-639, 2011.

MASON, T. G. et al. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, n. 41, p. R635–R666, 2006.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719-1729, 2012.

MELO, K. M. *et al.* Short-term exposure to low doses of rotenone induces developmental, biochemical, behavioral, and histological changes in fish. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 18, p. 13926–13938, 2015.

MOREIRA DE MORAIS, J. et al. Physicochemical characterization of canola oil/water nanoemulsions obtained by determination of required HLB number and emulsion phase inversion methods. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 109–115, 2006.

MOREIRA, E. L. G. et al. Proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 117, n. 12, p. 1337–1351, 2010.

MYTHRI, R. B.; HARISH, G.; BHARATH, M. M. Therapeutic potential of natural products in Parkinson's disease. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, v. 6, n. 3, p. 181-200, 2012.

NAGEL, R. DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*--a general model in ecotoxicology and toxicology. **ALTEX**, v. 19 Suppl 1, p. 38–48, 2002.

NALLS, M. A. et al. Diagnosis of Parkinson's disease on the basis of clinical and genetic classification: a population-based modelling study. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 10, p. 1002-1009, 2015.

NANDA, N. B. P.; DAS, P. C.; JENA, J. Use of rotenone as piscicide: Toxicity levels in a few common freshwater predatory and weed fishes. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 21, n. 4, p. 241–249, 2009.

NELLORE, J.; NANDITA, P. Paraquat exposure induces behavioral deficits in larval zebrafish during the window of dopamine neurogenesis. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 950–956, 2015.

NGUYEN, M. et al. Developing 'integrative' zebrafish models of behavioral and metabolic disorders. **Behavioural Brain Research**, v. 256, p. 172–187, 2013.

NUTT, J. G.; WOOTEN, G. F. Diagnosis and Initial Management of Parkinson's Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 10, p. 1021–1027, 2005.

- OBESO, J. A. et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. **Movement Disorders**, v. 32, n. 9, p. 1264-1310, 2017.
- OERTEL, W.; SCHULZ, J. B. Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 325–337, 2016.
- OLANOW, C. W. et al. Continuous intrajejunal infusion of levodopa-carbidopa intestinal gel for patients with advanced Parkinson's disease: a randomised, controlled, double-blind, double-dummy study. **The Lancet Neurology**, v. 13, n. 2, p. 141–149, 2014.
- OLIVEIRA, R. F. Mind the fish: zebrafish as a model in cognitive social neuroscience. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7, 2013.
- OSTERTAG, F.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J. Journal of Colloid and Interface Science Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 388, n. 1, p. 95–102, 2012.
- PANGENI, R. et al. Vitamin E loaded resveratrol nanoemulsion for brain targeting for the treatment of Parkinson's disease by reducing oxidative stress. **Nanotechnology**, v. 25, n. 48, p. 485102, 2014.
- PANULA, P. et al. The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 40, n. 1, p. 46–57, 2010.
- PEZZOLI, G.; CEREDA, E. Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson disease. **Neurology**, v. 80, n. 22, p. 2035–2041, 2013.
- PLETSCHER, A.; DAPRADA, M. Pharmacotherapy of Parkinson's disease: research from 1960 to 1991. **Acta neurologica Scandinavica**, v. 146, p. 26-31, 1993.
- POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature reviews, Disease primers**, v. 3, n. 1, p. 17013, 2017.
- POSTUMA, R. B. et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease **Movement Disorder**, v. 30, n. 12, p. 1591-1601, 2015.
- POTASHKIN, J. A.; BLUME, S. R.; RUNKLE, N. K. Limitations of Animal Models of Parkinson's Disease. **Parkinson's Disease**, v. 2011, p. 1–7, 2011.
- RABIEI, Z.; SOLATI, K.; AMINI-KHOEI, H. Phytotherapy in treatment of Parkinson's disease: a review. **Pharmaceutical Biology**, v. 57, n. 1, p. 355–362, 2019.
- RADAD, K. *et al.* Rotenone: from modelling to implication in Parkinson's disease. **Folia Neuropathologica**, v. 57, n. 4, p. 317–326, 2019.
- RAMAZANI, E. *et al.* Protective effects of Cinnamomum verum, Cinnamomum cassia and cinnamaldehyde against 6-OHDA-induced apoptosis in PC12 cells. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 4, p. 2437–2445, 2020.

- RAMIRES JÚNIOR, O. V. *et al.* Nanoemulsion Improves the Neuroprotective Effects of Curcumin in an Experimental Model of Parkinson's Disease. **Neurotoxicity Research**, v. 39, n. 3, p. 787–799, 2021.
- RASHED, A.; ABD RAHMAN, A. Z.; RATHI, D. N. G. Essential Oils as a Potential Neuroprotective Remedy for Age-Related Neurodegenerative Diseases: A Review. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1107, 2021.
- RAZALI, K. *et al.* The Promise of the Zebrafish Model for Parkinson's Disease: Today's Science and Tomorrow's Treatment. **Frontiers in Genetics**, v. 12, 2021.
- RIZEK, P.; KUMAR, N.; JOG, M. S. **An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease**CMAJCanadian Medical Association, 2016.
- ROBEA, M.-A. *et al.* Parkinson's Disease-Induced Zebrafish Models: Focussing on Oxidative Stress Implications and Sleep Processes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–15, 2020.
- ROCCA, W. A. The burden of Parkinson's disease: a worldwide perspective. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 11, p. 928-929, 2018.
- SAMFIRA, I. *et al.* Characterization and identity confirmation of essential oils by mid infrared absorption spectrophotometry. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 10, n. 2, p. 557-566, 2015.
- SANTOS, G. F. *et al.* Doença de Parkinson: Padrão epidemiológico de internações no Brasil. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e13511124535, 2022.
- SARACENI, P. R. *et al.* Establishment of Infection Models in Zebrafish Larvae (*Danio rerio*) to Study the Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–14, 2016.
- SARATH BABU, N. *et al.* 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induced Parkinson's disease in zebrafish. **Proteomics**, v. 16, n. 9, p. 1407–1420, 2016.
- SARRAFCHI, A. *et al.* Oxidative stress and Parkinson's disease: New hopes in treatment with herbal antioxidants. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 2, p. 238–246, 2015.
- SAVICA, R. *et al.* Incidence and pathology of synucleinopathies and tauopathies related to parkinsonism. **JAMA Neurology**, v. 70, n. 7, p. 859–866, 2013.
- SÉGALAT, L. Invertebrate Animal Models of Diseases as Screening Tools in Drug Discovery. **ACS Chemical Biology**, v. 2, n. 4, p. 231–236, 2007.
- SELDERSLAGHS, I. W. T. *et al.* Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. **Reproductive Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 308–320, 2009.
- SHAHPIRI, Z. *et al.* Phytochemicals as future drugs for Parkinson's disease: a comprehensive review. **Reviews in the Neurosciences**, v. 27, n. 6, p. 651–668, 2016.

- SHI, Z. et al. Neuroprotective effects of aqueous extracts of *Uncaria tomentosa*: Insights from 6-OHDA induced cell damage and transgenic *Caenorhabditis elegans* model. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 7, p. 940–947, 2013.
- SHIN, J. T.; FISHMAN, M. C. From Zebrafish to human: modular medical models. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 3, n. 1, p. 311–40, 2002.
- SHRIVASTAVA, P. *et al.* Anti-apoptotic and Anti-inflammatory effect of Piperine on 6-OHDA induced Parkinson's Rat model. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 680–687, 2013.
- SILVEIRA, T. R. Da; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, p. 4–5, 2012.
- SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, 2017.
- SOLANS, C.; MORALES, D.; HOMS, M. Spontaneous emulsification. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 22, p. 88–93, 2016.
- SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, v. 83, n. 1, p. 13–34, 2007.
- SRINIVASAN, K. Black Pepper and its Pungent Principle-Piperine: A Review of Diverse Physiological Effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 8, p. 735–748, 2007.
- TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, 2004.
- TAKOOREE, H. *et al.* A systematic review on black pepper (*Piper nigrum* L.): from folk uses to pharmacological applications. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, p. S210–S243, 2019.
- TAMBASCO, N.; ROMOLI, M.; CALABRESI, P. Levodopa in Parkinson's Disease: Current Status and Future Developments. **Current Neuropharmacology**, v. 16, n. 8, p. 1239–1252, 2018.
- TANNER, C. M. *et al.* Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 6, p. 866–872, 2011.
- THIRUGNANAM, T.; SANTHAKUMAR, K. Chemically induced models of Parkinson's disease. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 252, p. 109213, 2022.
- VALLI, M. et al. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 3, p. 439–444, 2013.

VAZ, R. L.; OUTEIRO, T. F.; FERREIRA, J. J. Zebrafish as an Animal Model for Drug Discovery in Parkinson's Disease and Other Movement Disorders: A Systematic Review. **Frontiers in Neurology**, v. 9, p. 347, 2018.

VIJAYANATHAN, Y. *et al.* 6-OHDA-Lesioned Adult Zebrafish as a Useful Parkinson's Disease Model for Dopaminergic Neuroregeneration. **Neurotoxicity Research**, v. 32, n. 3, p. 496–508, 2017.

VLAAR, T. *et al.* Association of Parkinson's disease with industry sectors: a French nationwide incidence study. **European Journal of Epidemiology**, v. 33, n. 11, p. 1101–1111, 2018.

WAGER, K.; RUSSELL, C. Mitophagy and neurodegeneration. **Autophagy**, v. 9, n. 11, p. 1693–1709, 2013.

WANG, X. H. *et al.* Paraquat affects mitochondrial bioenergetics, dopamine system expression, and locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 191, p. 106–117, 2018.

WANG, Y. *et al.* Parkinson's disease-like motor and non-motor symptoms in rotenone-treated zebrafish. **NeuroToxicology**, v. 58, p. 103–109, 2017.

WILLIAMS, C. H.; HONG, C. C. Multi-Step Usage of in Vivo Models During Rational Drug Design and Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 4, p. 2262–2274, 2011.

WIRDEFELDT, K. *et al.* Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **European Journal of Epidemiology**, v. 26, n. S1, p. 1–58, 2011.

WRANGEL, C. Von *et al.* The rotenone-induced rat model of Parkinson's disease: Behavioral and electrophysiological findings. **Behavioural Brain Research**, v. 279, p. 52–61, 2015.

YAN, M. H.; WANG, X.; ZHU, X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 90–101, 2013.

YANG, J.-X.; CHEN, L. Economic Burden Analysis of Parkinson's Disease Patients in China. **Parkinson's Disease**, v. 2017, p. 1–7, 2017.

YANG, W. *et al.* Current and projected future economic burden of Parkinson's disease in the U.S. **npj Parkinson's Disease**, v. 6, n. 1, 2020.

YASUHARA, T. *et al.* Cell Therapy for Parkinson's Disease. **Cell Transplantation**, v. 26, n. 9, p. 1551–1559, 2017.

YORITAKA, A. *et al.* The direct cost of Parkinson disease at Juntendo medical university hospital, Japan. **Internal Medicine**, v. 55, n. 2, p. 113–119, 2016.

ZAINOL, S. *et al.* Formulation Optimization of a Palm-Based Nanoemulsion System Containing Levodopa. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 10, p. 13049–13064, 2012.

ZESIEWICZ, T. A. Parkinson Disease. **CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology**, v. 25, n. 4, p. 896–918, 2019.

ZHANG, Z. J. *et al.* Ethanolic extract of fructus *alpinia oxyphylla* protects against 6-hydroxydopamine-induced damage of PC12 cells in vitro and dopaminergic neurons in zebrafish. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 32, n. 1, p. 27–40, 2012.

APÊNDICE A – PATENTE DE INVENÇÃO BR 10 2019 009007-3 A2: “DISPOSITIVO TIPO TORRE PARA CAPTAÇÃO DE IMAGENS PARA OBTENÇÃO DE DADOS COMPORTAMENTAIS DE ANIMAIS AQUÁTICOS EM VIVEIRO”.



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102019009007-3 A2



(22) Data do Depósito: 02/05/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 10/11/2020

(54) Título: DISPOSITIVO TIPO TORRE PARA CAPTAÇÃO DE IMAGENS PARA OBTENÇÃO DE DADOS COMPORTAMENTAIS DE ANIMAIS AQUÁTICOS EM VIVEIRO

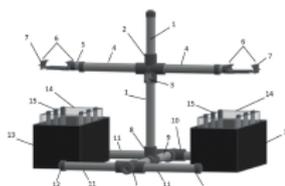
(51) Int. Cl.: A61B 5/11; A01K 63/00; A01K 61/00; A61B 90/00.

(52) CPC: A61B 5/11; A01K 63/00; A01K 61/00; A61B 90/00.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) Inventor(es): ANDRE LUCAS CORREA DE ANDRADE; PRISCILA RAFAELA LEO SOARES; JADSON FREITAS DA SILVA; MARILIA RIBEIRO SALES CADENA; PABYTON GONCALVES CADENA.

(57) Resumo: DISPOSITIVO TIPO TORRE PARA CAPTAÇÃO DE IMAGENS PARA OBTENÇÃO DE DADOS COMPORTAMENTAIS DE ANIMAIS AQUÁTICOS EM VIVEIRO. O presente pedido de patente de invenção pertence ao setor tecnológico de dispositivos para pesquisas biológicas em biotérios. Trata-se de um dispositivo para obtenção de imagens e vídeos visando a realização de testes comportamentais em modelos de animais aquáticos que compreende uma de torre para captação de imagens com dois suportes telescópicos para acoplamento de câmeras de vídeo ou smartphones, com regulagem de altura, capacidade para acoplamento de outras torres permitindo aumentar o número de filmagens, uma barreira física externa para reduzir a interferência exterior no comportamento e viveiros que são preferencialmente aquários possibilitando diferentes configurações podendo ser usado no Modelo de Teste de Escototaxia, Teste de Campo Aberto, Modelo de Teste de Motilidade dentre outros com aplicação em vários tipos de pesquisa.



A patente de invenção número BR 10 2019 009007-3 A2, intitulada: "Dispositivo tipo torre para captação de imagens para obtenção de dados comportamentais de animais aquáticos em viveiro", encontra-se devidamente depositada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial. Para ter acesso ao texto da patente visite o site do INPI: <https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/LoginController?action=login>, clique na opção "Patentes" e utilize o número da patente (102019009007-3) para fazer a busca, como mostrado nas figuras abaixo:

PESQUISA BÁSICA

Forneça abaixo as chaves de pesquisa desejadas. Evite o uso de frases ou palavras genéricas.

Contenha o Número do Pedido ?

RESULTADO DA PESQUISA

Pesquisa por:

Nº Pedido: '102019009007-3' \

Foram encontrados 1 processos que satisfazem à pesquisa. Mostrando página 1 de 1.

Pedido	Depósito	Título	IPC
BR 10 2019 009007 3	02/05/2019	DISPOSITIVO TIPO TORRE PARA CAPTAÇÃO DE IMAGENS PARA OBTENÇÃO DE DADOS COMPORTAMENTAIS DE ANIMAIS AQUÁTICOS EM VIVEIRO	A61B 5/11

APÊNDICE B – DESENHO INDUSTRIAL BR 30 2020 002588-1: “CONFIGURAÇÃO APLICADA A DISPOSITIVO TIPO TORRE PARA CAPTAÇÃO DE IMAGENS”.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
DIRETORIA DE MARCAS, DESENHOS INDUSTRIAIS E INDICAÇÕES GEOGRÁFICAS

CERTIFICADO DE REGISTRO DE DESENHO INDUSTRIAL

BR 302020002588-1

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede, automaticamente, sem exame de mérito, o presente CERTIFICADO DE REGISTRO, que outorga ao seu titular propriedade do desenho industrial discriminado neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dele decorrentes, previstos na legislação em vigor.

A proteção conferida pelo registro de desenho industrial, em conformidade com o que estabelece o art. 95 da Lei 9.279/96, é definida exclusivamente a partir da configuração da forma plástica ornamental do objeto ou do conjunto ornamental de linhas e cores requeridos.

(21) Número do Depósito: BR 302020002588-1

(22) Data do Depósito: 16/06/2020

(45) Data de Concessão: 04/05/2021

(52) Classificação Internacional de Desenhos Industriais: 14-06.

(30) Prioridade Unionista:

(54) Título: CONFIGURAÇÃO APLICADA AEM DISPOSITIVO TIPO TORRE PARA CAPTAÇÃO DE IMAGENS

O desenho industrial número BR 30 2020 002588-1, intitulado: “Configuração aplicada a dispositivo tipo torre para captação de imagens”, encontra-se devidamente depositado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial. Para ter acesso ao texto do desenho industrial visite o site do INPI: <https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/LoginController?action=login>, clique na opção "Desenho Industrial" e utilize o número 30 2020 002588-1 para fazer a busca, como mostrado nas figuras abaixo:

The first screenshot shows the INPI homepage with the 'Desenho Industrial' option highlighted in a red box. The second screenshot shows the search results page with the search criteria '30 2020 002588-1' entered. The third screenshot shows the search results table.

Consulta Base de Dados do INPI

[Ajuda? | [Login](#) | [Cadastre-se aqui..](#)]

BRASIL | Acesso à informação | Participe | Serviços | Legislação | Canais

Instituto Nacional da Propriedade Industrial
Ministério da Economia

Consulta Base de Dados do INPI

[Ajuda? | [Login](#) | [Cadastre-se aqui..](#)]

Marca
 Patente

Desenho Industrial
 Indicação Geográfica

Programa de Computador
 Topografia de Circuito Integrado

Transferência de Tecnologia
 Informação Tecnológica de Patentes

BRASIL | Acesso à informação | Participe | Serviços | Legislação | Canais

Instituto Nacional da Propriedade Industrial
Ministério da Economia

Consulta à Base de Dados do INPI

[Início | Ajuda? | [Login](#) | [Cadastre-se aqui..](#)]

» Consultar por: [Base Desenhos](#) | [Pesquisa Avançada](#) | [Finalizar Sessão](#)

Forneça abaixo as chaves de pesquisa desejadas. Evite o uso de frases ou palavras genéricas.

PESQUISA BÁSICA

Contenha o Número do Pedido ?

BRASIL | Acesso à informação | Participe | Serviços | Legislação | Canais

Instituto Nacional da Propriedade Industrial
Ministério da Economia

Consulta à Base de Dados do INPI

[Início | Ajuda?]

» Consultar por: [Base Desenhos](#) | [Finalizar Sessão](#)

RESULTADO DA PESQUISA

Pesquisa por:

Nº Pedido: '30 2020 002588-1' \ Foram encontrados **1** processos que satisfazem à pesquisa. Mostrando página **1** de **1**.

Pedido	Depósito	Título	Clas
BR 30 2020 002588 1	16/06/2020	CONFIGURAÇÃO APLICADA A/EM DISPOSITIVO TIPO TORRE PARA CAPTAÇÃO DE IMAGENS	14-06

APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO: "EFEITOS MOTORES DA ROTENONA EM ZEBRAFISH COMO MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON-LIKE"



Efeitos motores da rotenona em *zebrafish* como modelo animal da doença de Parkinson-like

Motor effects of rotenone in *zebrafish* as an animal model of Parkinson-like disease

Efectos motores de la rotenona en *zebrafish* como modelo animal de enfermedad similar a la de Parkinson

André Lucas Corrêa de Andrade¹, Renatta Priscilla Ferreira Silva¹, Jadson Freitas da Silva², Pabyton Gonçalves Cadena^{1,2}.

RESUMO

Objetivo: Analisar a indução de sintomas semelhantes à Doença de Parkinson em *zebrafish* pela exposição à rotenona. **Métodos:** Trata-se de um estudo experimental, conduzido em *zebrafish* adultos divididos em três grupos, um grupo controle, exposto à 1% (v/v) de DMSO e dois grupos expostos à 2 e 5 µg/L de rotenona por 28 dias consecutivos. Foram avaliados a atividade locomotora dos animais nos seguintes parâmetros: distância total, velocidade média e tempo parado. Parâmetros não-motores foram avaliados no teste de preferência claro/escuro para observar alterações comportamentais. **Resultados:** Reduções significativas entre os grupos expostos à rotenona (2 e 5 µg/L) em relação ao grupo controle foram observadas nos parâmetros de distância total (14,97 e 18,84%), velocidade média (15,05 e 18,39%) e número de linhas cruzadas (15,74 e 21,96%). Aumento do tempo parado de 82,15% foi observado apenas no grupo exposto à 5 µg/L de rotenona. Alterações na preferência de claro/escuro não foram observadas. A taxa de mortalidade foi de 15 e 35% para os grupos com 2 e 5 µg/L de rotenona, respectivamente. **Conclusão:** As concentrações de rotenona estudadas foram capazes de produzir efeitos negativos na atividade locomotora dos peixes, causando sintomas motores semelhantes à Doença de Parkinson.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, Atividade locomotora, Modelo animal.

ABSTRACT

Objective: Analyze the induction of Parkinson-like disease symptoms in zebrafish by rotenone exposure. **Methods:** This is an experimental study conducted on adult zebrafish divided into three different groups, a control group exposed to 1% (v/v) DMSO and two groups exposed to 2 and 5 µg/L of rotenone for 28 consecutive days. The locomotor activity of the animals was evaluated in the following parameters: total distance, average speed, and stopped time. Non-motor parameters were evaluated in the light/dark preference test to observe behavioral changes. **Results:** Significant reductions between the groups exposed to rotenone (2 and 5 µg/L) compared to the control group were observed in the parameters of the total distance (14.97 and 18.84%), mean speed (15.05 and 18.39%), and the number of crossed lines (15.74 and 21.96%). An increase in downtime of 82.15% was observed only in the group exposed to 5 µg/L of rotenone. Changes in light/dark preference were not observed. The mortality rate was 15 and 35% for the 2 and 5 µg/L rotenone groups, respectively. **Conclusion:** The rotenone concentrations studied were able to produce negative effects on the locomotor activity of fish, causing Parkinson-like disease motor symptoms.

Keywords: Parkinson's disease, Locomotor activity, Animal model.

¹ Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife - PE.

² Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife - PE.

SUBMETIDO EM: 4/2022 | ACEITO EM: 5/2022 | PUBLICADO EM: 5/2022

APÊNDICE D – APRESENTAÇÃO ORAL: "EFEITOS MOTORES DA ROTENONA EM ZEBRAFISH COMO MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON-LIKE"

Acervo Mais Publicações Científicas
CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO EM PODCAST

Modalidade:	Apresentação Oral de Trabalho Científico
Título:	Efeitos motores da rotenona em zebrafish como modelo animal da doença de Parkinson-like
Autoria:	André Lucas Corrêa de Andrade, Renatta Priscilla Ferreira Silva, Jadson Freitas da Silva, Pabyton Gonçalves Cadena.
Local:	Plataforma do Spotify Canal da Acervo+ Index Base
Publicado:	Julho de 2022
Link:	https://open.spotify.com/episode/0tK4vEzBYlgh1cXDo8Xt6n?si=I3JGxP34TIKEw6fzLyzvLQ

Brasil,
 08 de Julho de 2022.



Dr. Andreazzi Duarte
 Editor-líder da Acervo+



Este documento foi assinado eletronicamente por Dr. Andreazzi Duarte.
 Para verificar as assinaturas vá ao site <https://www.portaldeassinaturas.com.br/443> e utilize o código F2F7-3358-442D-EFED.

Este documento foi assinado eletronicamente por Dr. Andreazzi Duarte.
 Para verificar as assinaturas vá ao site <https://www.portaldeassinaturas.com.br/443> e utilize o código F2F7-3358-442D-EFED.

**APÊNDICE E – RESUMO PUBLICADO NO 56º CONGRESSO ANUAL DA
SOCIEDADE BRASILEIRA DE FISIOLÓGIA: “EVALUATION OF THE TOXIC
EFFECTS OF ROTENONE ON EARLY STAGES OF *DANIO RERIO* BY
BEHAVIORAL AND MOTOR TESTS”**

Certificado

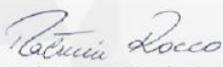


**SBFIS
ONLINE**
12 a 17 de Outubro de 2021

LVI CONGRESSO ANUAL DA SBFIS
VIII Encontro Científico do Programa de Pós-Graduação
Multicêntrico em Ciências Fisiológicas
IV Encontro do Controle Neural da Respiração
XIII Simpósio Internacional de Peptídeos Vasoativos

**A FISIOLÓGIA MULTICÊNTRICA E A
DEMOCRATIZAÇÃO DO CONHECIMENTO**

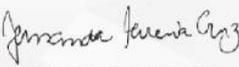
Certificamos que o Trabalho Científico intitulado: Evaluation of the toxic effects of rotenone on early stages of *Danio rerio* by behavioral and motor tests, dos autores: Renatta Priscila Ferreira da Silva, André Lucas Correa de Andrade, Pabyton Gonçalves Cadena foi apresentado no 56º CONGRESSO ANUAL DA SBFIS 2021 ON-LINE, realizado na plataforma Virtuali Eventos no período de 11/10/2021 a 17/10/2021



Patricia Rieken Macedo Rocco
Presidente da SBFIS



Pedro Leme Silva
Secretário da SBFIS



Fernanda Ferreira Cruz
Tesoureira da SBFIS

REALIZAÇÃO:  **SBFis**
Sociedade Brasileira de Fisiologia

APOIO:               

ORGANIZAÇÃO: 

SBFIS ePoster Abstracts/Resumos



October 12 - 17, 2021

ID: 5532

Área: Neurofisiologia

Forma de Apresentação: E-POSTER

Autores: Renatta da Silva, André de Andrade, Pabyton Cadena

Instituições: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

EVALUATION OF THE TOXIC EFFECTS OF ROTENONE ON EARLY STAGES OF DANIO RERIO BY BEHAVIORAL AND MOTOR TESTS

Rotenone (RT) is a natural organic molecule. In excess, it degenerates dopaminergic neurons inducing their death and deforming Lewy bodies. This pesticide is a prototype of exogenous toxin with Parkinson-like clinical attributes in the animal model. Thus, the aim of this work is to evaluate the behavioral and motor parameters of *Danio rerio* larvae exposed to RT. The protocol nº 3581030221 was approved by the CEUA - UFRPE. Larvae ($n = 352$) with 6 days post-fertilization (dpf) were housed 48 well-plates, divided into 5 groups, control (CG - 0.01% DMSO) and groups exposed to 5, 10, 15 and 20 $\mu\text{g/L}$ of RT (G5, G10, G15, and G20). The thigmotaxis test (TH) was used to assess anxiety-like behavior, after 10 minutes of acclimatization, it recorded whether the larvae were near or away from the wall. Optomotor response (OMR) data were collected submitting the well-plates with larvae above on the tablet with a video that simulates the water stream to count the number of larvae that followed the stimulus direction (SD). The video, captured by a cellphone camera, consisted of 5s of white to Initial Time (IT), the 30s of alternating lines in the right direction to middle time (MT), and 30s of alternating lines in the left direction to final time (FT). The TH results were compared by one-way ANOVA followed by the Tukey test, and OMR was analyzed by the McNemar test with $p < 0.05$. There was a decrease of TH in G15 and G20 compared to CG. The OMR SE rate in IT was CG 24%; G5 35%; G10 26%; G15 and G20 20%. In MT was GC 61%; G5 63%; G10 53%; G15 54%; G20 43%. In the FT was GC 75%; G5 68%; G10 66%; G15 57%; G20 61%. No changes were observed in the OMR test. In our test, RT reduced TH, indicating behavioral changes. OMR test can be used to detect visual impairment thus, RT concentrations did not cause changes in this test. Therefore, RT induced behavioral changes, but not visual impairments.

APÊNDICE F – PATENTE DE INVENÇÃO BR 10 2020 024914 2: “PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTENDO LEVODOPA ENCAPSULADA”.



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020024914-2 A2



(22) Data do Depósito: 07/12/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 14/06/2022

(54) Título: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTENDO LEVODOPA ENCAPSULADA

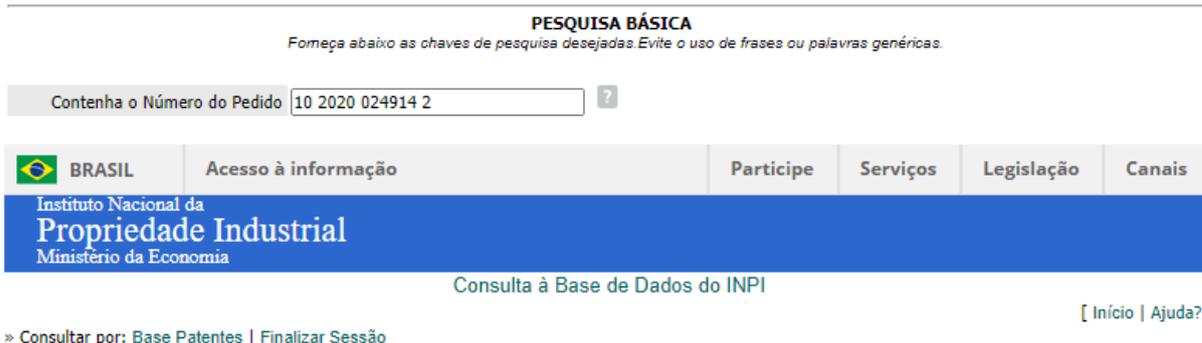
(51) Int. Cl.: A61K 36/67; A61P 25/28.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) Inventor(es): ANDRE LUCAS CORREA DE ANDRADE; RENATTA PRISCILLA FERREIRA SILVA; THAMIRIS PINHEIRO SANTOS; PAULO EDUARDO DA SILVA BASTOS; AMANDA RODRIGUES DOS SANTOS; ESTER INACIO DAMIAO QUINOVA; TIAGO QUEIROZ DA MOTA BITTENCOURT; CLAUDIO AUGUSTO GOMES DA CAMARA; MARCILIO MARTINS DE MORAES; PABYTON GONCALVES CADENA.

(57) Resumo: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTENDO LEVODOPA ENCAPSULADA. A invenção pertence ao setor tecnológico de bionanotecnologia com destaque na utilização de técnicas de nanoemulsificação aplicadas à uma possível melhora das propriedades físico-químicas e fisiológicas da levodopa. Trata-se de um processo para produção de nanoemulsões O/A com vesículas de tamanho inferiores a 300 nm para encapsulação do fármaco Levodopa para melhoramento no tratamento da Doença de Parkinson, devido ao fato da Levodopa ser um fármaco com uma distribuição descontínua no organismo, tempo de meia-vida curta e baixa biodisponibilidade. A nanoemulsão é produzida pelo método de baixa energia a partir da emulsificação espontânea do óleo essencial de Piper nigrum, do surfactante polissorbato 80, da Levodopa combinada a inibidores da dopa-decarboxilase, na fase oleosa, e do tampão fosfato em pH neutro, como fase aquosa. Além disso, em sua fase oleosa devido a presença do óleo de Piper nigrum contém níveis de terpenos, compostos ativos que possuem atividade antioxidante que podem melhorar no tratamento da Doença de Parkinson.

A patente de invenção número BR 10 2020 024914 2, intitulada: “Processo de produção de nanoemulsão a base de óleos essenciais contendo Levodopa encapsulada”, encontra-se devidamente depositada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial. Para ter acesso ao texto da patente visite o site do INPI: <https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/LoginController?action=login>, clique na opção "Patentes" e utilize o número da patente (10 2020 024914 2) para fazer a busca, como mostrado nas figuras abaixo:



RESULTADO DA PESQUISA

Pesquisa por:

Nº Pedido: '10 2020 024914 2' \

Foram encontrados 1 processos que satisfazem à pesquisa. Mostrando página 1 de 1.

Pedido	Depósito	Título	IPC
BR 10 2020 024914 2	07/12/2020	PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTENDO LEVODOPA ENCAPSULADA	A61K 36/67

APÊNDICE G – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS PROTOCOLO NÚMERO 114/2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA -I- 14

Licença condicional para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

A Comissão de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	114/2018
Número do processo	23082.022433/2018-96
Data de emissão da licença	31 de outubro de 2018
Título do Projeto	Desenvolvimento de nanoemulsões a partir de óleos essenciais contendo levodopa encapsulada para o tratamento da Doença de Parkinson em modelo de peixe zebrafish (Danio rerio).
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Pabyton Gonçalves Cadena
Colaboradores	André Lucas Corrêa de Andrade, Marília Cordeiro Galvão da Silva, Thamiris Pinheiro Santos
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Peixe; macho: adulto 105, embrião 210, fêmea adulto 105, embrião 210. Total: 630

Prof. Dr. Carlos F. R. Guarana
Vice-Presidente CEUA/UFRPE
SIAPE 2116228

Profa. ~~Dra.~~ Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
(Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA / UFRPE)

APÊNDICE H – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS PROTOCOLO NÚMERO 3581030221



*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da associação da Levodopa com óleo essencial de Piper nigrum de forma livre e em nanoemulsão como um novo produto para o tratamento da Doença de Parkinson utilizando zebrafish (Danio rerio) como modelo animal", protocolada sob o CEUA nº 3581030221 (ID 000575), sob a responsabilidade de **Pabyton Gonçalves Cadena e equipe; André Lucas Corrêa de Andrade; Renatta Priscilla Ferreira Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE) na reunião de 10/02/2021.

We certify that the proposal "Study of the association of Levodopa with Piper nigrum essential oil in free form and in nanoemulsion as a new product for the treatment of Parkinson's Disease using zebrafish (Danio rerio) as an animal model", utilizing 1825 Fishes (males and females), protocol number CEUA 3581030221 (ID 000575), under the responsibility of **Pabyton Gonçalves Cadena and team; André Lucas Corrêa de Andrade; Renatta Priscilla Ferreira Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Rural Federal University of Pernambuco (CEUA/UFRPE) in the meeting of 02/10/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [03/2021](#) a [03/2024](#) Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem:	Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal - LECA		
Espécie:	Peixes	sexo:	Machos e Fêmeas
Linhagem:	WT (selvagem)	idade:	3 a 12 meses
		Peso:	1 a 2 g
<hr/>			
Origem:	Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal - LECA		
Espécie:	Peixes	sexo:	Machos e Fêmeas
Linhagem:	WT (selvagem)	idade:	1 a 7 dias
		Peso:	1 a 1 g
<hr/>			

Local do experimento: No Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal - LECA

Recife, 10 de fevereiro de 2021

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite de Souza
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Carlos Fernando Rodrigues Guaraná
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural de Pernambuco