



**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição  
FACFAN**



**DANIELE BARBOZA MIRANDA GUIMARÃES**

**EFEITOS NEUROPROTETORES PERSISTENTES DO  
TRATAMENTO REPETIDO COM O ANÁLOGO  
TRIAZÓLICO DA GRANDISINA EM UM MODELO ANIMAL  
DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

**Campo Grande – MS**

**2024**

DANIELE BARBOZA MIRANDA GUIMARÃES

**EFEITOS NEUROPROTETORES PERSISTENTES DO  
TRATAMENTO REPETIDO COM O ANÁLOGO  
TRIAZÓLICO DA GRANDISINA EM UM MODELO ANIMAL  
DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição – FACFAN, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS como requisito para a conclusão do Curso de Graduação em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Davi Campos La Gatta

**Campo Grande – MS**

**2024**

DANIELE BARBOZA MIRANDA GUIMARÃES

**EFEITOS NEUROPROTETORES PERSISTENTES DO TRATAMENTO  
REPETIDO COM O ANÁLOGO TRIAZÓLICO DA GRANDISINA EM UM  
MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição – FACFAN, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS como requisito para a conclusão do Curso de Graduação em Farmácia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Davi Campos La Gatta**

**Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

---

**Prof. Dr. Eduardo Benedetti Parisotto**

**Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

---

**Prof. Dra. Thalita Bachelli Riul**

**Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

## RESUMO

**Introdução:** A doença de Alzheimer (DA) é resultante da deposição da proteína beta-amiloide ( $\beta$ A) em regiões específicas do sistema nervoso central, tais como o córtex e hipocampo ativando vias inflamatórias e oxidantes, resultando em neurodegeneração. A memantina é utilizada em casos moderados da doença. Contudo, ela apresenta limitações, como a perda de eficácia em casos mais avançados, o que é corroborado em modelos animais da DA. Um estudo recentemente publicado por nosso grupo de pesquisa, demonstrou que o análogo triazólico da grandisina (ATG) previne o prejuízo cognitivo em animais que receberam administração de oligômeros de  $\beta$ A, através de efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. Entretanto, para avaliar possíveis efeitos persistentes do ATG será necessário comparar o efeito desta molécula-teste com a memantina neste mesmo modelo. **Objetivo:** Analisar os efeitos agudos e tardios do tratamento repetido com o ATG, em camundongos submetidos ao modelo da DA, utilizando a memantina como controle positivo. **Metodologia:** Foram utilizados camundongos C57/Bl6 de 3 meses de idade (protocolo CEUA: 1.129/2020). Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante unilateral de cânula-guia no ventrículo esquerdo para injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de oligômeros de  $\beta$ A ou veículo. Vinte e quatro horas após a cirurgia foi iniciado o tratamento farmacológico repetido por via intraperitoneal (i.p.) com ATG, veículo ou memantina (MEM), por 14 dias. Os animais foram separados em 4 grupos de acordo com o tratamento, sendo eles: controle (i.c.v.)/veículo (i.p.), beta-amiloide (i.c.v.)/veículo (i.p.), beta-amiloide (i.c.v.)/MEM (i.p.) e beta-amiloide (i.c.v.)/ATG (i.p.). O teste de reconhecimento de objetos (TRO) foi utilizado para avaliação da atividade cognitiva dos animais e foi repetido no 8º e 16º dias após a injeção de  $\beta$ A. Após a realização do TRO os animais foram eutanasiados e o córtex e hipocampo foram dissecados para análises moleculares. **Resultados:** A MEM induziu efeitos neuroprotetores após 7 dias de tratamento, ao passo que o mesmo efeito não foi observado após o 14º dia. Por outro lado, o AGT preveniu o prejuízo da memória de reconhecimento dos animais após 7 e 14 dias de tratamento, sugerindo efeitos neuroprotetores persistentes. Além disso, houve redução do nível de peroxidação lipídica no córtex e hipocampo dos animais, demonstrando efeitos antioxidantes e neuroprotetores do composto. Ademais, os níveis de citocinas pró-inflamatórias foram reduzidos pelo ATG no hipocampo, porém não pela MEM. **Conclusão:** O derivado triazólico da grandisina apresentou potencial neuroprotetor devido aos seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, além de prevenir o prejuízo cognitivo persistente induzido pela injeção de beta-amiloide.

**Palavras-chave:** Doença de Alzheimer; Memantina; Grandisina, Neuroproteção; Drogas multi-alvo.

## ABSTRACT

**Introduction:** Alzheimer's disease (AD) results from the deposition of beta-amyloid ( $\beta$ A) protein in specific regions of the central nervous system, such as the cortex and hippocampus, activating inflammatory and oxidative pathways, leading to neurodegeneration. Memantine is used in moderate cases of the disease. However, it has limitations, such as loss of efficacy in more advanced cases, which is corroborated by animal models of AD. A study recently published by our research group demonstrated that the triazolic analog of grandisine (ATG) prevents cognitive impairment in animals administered with  $\beta$ A oligomers, through anti-inflammatory and antioxidant effects. However, to assess possible persistent effects of ATG, it will be necessary to compare the effects of this test molecule with memantine in the same model. **Objective:** To analyze the acute and late effects of repeated treatment with ATG in mice subjected to the AD model, using memantine as a positive control. **Methodology:** Three-month-old C57/Bl6 mice were used (CEUA protocol: 1.129/2020). The animals underwent stereotaxic surgery for unilateral implantation of a guide cannula in the left ventricle for intracerebroventricular (i.c.v.) injection of  $\beta$ A oligomers or vehicle. Twenty-four hours after surgery, repeated pharmacological treatment was initiated via intraperitoneal (i.p.) injection with ATG, vehicle, or memantine (MEM) for 14 days. The animals were divided into 4 groups according to treatment: control (i.c.v.)/vehicle (i.p.), beta-amyloid (i.c.v.)/vehicle (i.p.), beta-amyloid (i.c.v.)/MEM (i.p.), and beta-amyloid (i.c.v.)/ATG (i.p.). The object recognition test (ORT) was used to evaluate the cognitive activity of the animals and was repeated on the 8th and 16th days after  $\beta$ A injection. After the ORT, the animals were euthanized, and the cortex and hippocampus were dissected for molecular analyses. **Results:** MEM induced neuroprotective effects after 7 days of treatment, whereas the same effect was not observed after the 14th day. On the other hand, ATG prevented the recognition memory impairment in animals after 7 and 14 days of treatment, suggesting persistent neuroprotective effects. Additionally, there was a reduction in lipid peroxidation levels in the cortex and hippocampus of the animals, demonstrating the antioxidant and neuroprotective effects of the compound. Furthermore, levels of pro-inflammatory cytokines were reduced by ATG in the hippocampus, but not by MEM. **Conclusion:** The triazolic derivative of grandisine showed neuroprotective potential due to its antioxidant and anti-inflammatory effects, in addition to preventing persistent cognitive impairment induced by beta-amyloid injection.

**Keywords:** Alzheimer's disease; Memantine; Grandisin, Neuroprotection; Multi-target drugs.

## APRESENTAÇÃO

Os dados do presente trabalho são parte do trabalho publicado por Andrade e colaboradores em 2023, no periódico científico ACS Chemical Neuroscience (Fator de impacto: 5.0-Apêndice 1).

### Referência:

#### **Neuroprotective Profile of Triazole Grandisin Analogue against Amyloid-Beta Oligomer-Induced Cognitive Impairment**

Victor H. B. de Andrade; Erick Y. M. Rodrigues; Nayara A. F. Dias; Gabriela F. C. Ferreira; Diego B. de Carvalho; Amarith R. das Neves; Paola M. V. Coronel; Murilo K. A. Yonekawa; Eduardo B. Parisotto; Edson A. dos Santos; Albert S. Souza; Edgar J. Paredes-Gamero; Kamylla S. de Sousa; Leticia L. de Souza; Leonardo B. M. Resstel; Adriano C. M. Baroni; Davi C. Lagatta. *ACS Chem. Neurosci.* **2023**, **14**, **24**, **4298–4310** – doi: 10.1021/acchemneuro.3c00443

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre apoiaram as minhas escolhas de vida, acima de tudo.

Aos meus melhores amigos de longa distância, Gabriel Nunes Oliveira, Omar Nathan Sampaio Martins, Johann Maravieski Muniz Chiritt e Júlia Salina Judacewski, que por muitas ligações de discord e whatsapp se fizeram presentes.

Ao meu melhor amigo, Luiz Fernando Harthcapf Sobrinho, obrigada por todos os tererés e, principalmente, por fazer parte.

Ao meu melhor amigo, Mateus Higa Barbosa, por todas as companhias de carnaval.

À minha prima, Maria Clara Nogueira Rinaldi, I wanna really really wanna zigazig ah.

À minha prima, Júlia Nogueira Guimarães, te amo desde sempre.

Aos meus amigos de toda sexta-feira e carnavais, e aos do belmar, sem vocês nenhuma procrastinação valeria a pena.

Ao cafezola, a faculdade teria sido muito mais difícil sem nosso café (litrão) semanal.

Aos meus sogros e à minha cunhada, obrigada por todos os churrascos de domingo.

À minha amiga bonitense, Ana Flávia Schiavo, por todos os tererés e conversas sobre a vida.

Aos meus amigos, Kauanne Vieira e Lucas Gertz, obrigada por todo amor e parceria.

Ao meu orientador -maravilhoso- Davi Campo La Gatta, obrigada pela oportunidade de fazer parte de um laboratório cheio de conhecimento. Você é uma grande inspiração.

Ao meu salsichinha falecido, Sneik José, por anos e anos de companheirismo, e aos que estão aqui ainda, Gragas Júnior e Lizzie Maria, por serem meu ponto de luz dentro de casa.

E, por fim, agradeço, por muito, a minha pilota vascaína preferida e amor de uma vida, Gabriela Reis Gonçalves da Cruz.

## **DEDICATÓRIAS**

Dedico este trabalho ao meu avô, Wanderley Barboza Alce (in memorian), um homem que me traz o conforto e a paz necessários para muitos desafios na vida. Daqui te brindo sempre.

Dedico também à minha avó, Luzanidia Martins Miranda, uma grande professora e mentora de vida, salute y plata.



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>5</b>
<b>APRESENTAÇÃO</b>	<b>7</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>8</b>
<b>DEDICATÓRIA</b>	<b>9</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>10</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
3.1. Objetivo Geral.	15
3.2. Objetivos Específicos.	16
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>16</b>
4.1. Animais.	16
4.2. Preparação dos oligômeros da proteína $\beta$ A fracionados.	16
4.3. Injeção intracerebroventricular de oligômeros da $\beta$ A.	16
4.4. Tratamento farmacológico.	17
4.5. Testes comportamentais.	17
4.6. Teste de reconhecimento de objeto (TRO).	17
4.7. Avaliação da lipoperoxidação.	18
4.8. Análise estatística.	18
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>18</b>
5.1. O ATG, mas não a MEM, previne o prejuízo cognitivo persistente induzido pela injeção de oligômeros de $\beta$ A.	18
5.2. O tratamento com ATG, mas não com a MEM previne a lipoperoxidação no córtex e hipocampo dos animais após 16 da injeção de A $\beta$ O.	20
5.3. O ATG, mas não a MEM, reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo de camundongos injetados com A $\beta$ O.	21
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>22</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>24</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>24</b>
<b>9. APÊNDICE 1</b>	<b>30</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A preocupação com a demência e a idade avançada existe desde a Roma Antiga, quando Marcus Túlio Cícero (106 - 43 a.C.) escreveu à respeito em seu livro “De Senectute”, em 44 a.C., onde mostra sua perspectiva sobre a terceira idade, à época com 62 anos de idade. Nele, há uma passagem que diz: “Estudo assiduamente a literatura grega e, para exercitar minha memória, aplico o método caro dos pitagóricos: toda noite procuro lembrar-me de tudo o que fiz, disse e ouvi.”. Esta passagem nos mostra como o autor considerava importante exercitar o cérebro mesmo em idade avançada, em prol de manter a memória ativa.

Assim, o relato de Cícero nos mostra que a busca pela saúde do cérebro sempre esteve presente, principalmente em relação à manutenção da memória. Neste contexto, a doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa frequentemente associada à idade, a qual apresenta manifestações cognitivas e neuropsiquiátricas, causando uma deficiência progressiva e eventual incapacitação do paciente. Foi primeiramente descrita em 1906, em uma mulher de 51 anos, por Alois Alzheimer, na Alemanha (Bird, 1998).

Atualmente, as formas de tratamentos não previnem a progressão da doença, apenas retardam seus efeitos neurodegenerativos. Com essa realidade, faz-se necessário a busca por novos fármacos multi-alvo que sejam capazes de desacelerar o progresso da DA, além de tentar garantir efeitos neuroprotetores.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A DA possui uma fisiopatologia muito diversa e, atualmente, está associada à presença das placas neurais com proteína  $\beta A$  (beta-amilóide), deposição extracelular de  $\beta A$  e emaranhados neurofibrilares. Estudos mostram que essas características começam a ser formadas antes do aparecimento de sintomas clínicos (DeTure *et al.*, 2019; Aisen *et al.*, 2017). Entretanto, ainda é desconhecida a forma como a doença realmente começa a se desenvolver (Fan *et al.*, 2019), mas sabe-se que sua ocorrência é influenciada por vários fatores, como: idade avançada, histórico familiar, fatores genéticos, baixa escolaridade, entre outros.

Mundialmente, cerca de 47 milhões de pessoas possuem demência (DATASUS). Uma das suas principais características é o aumento da incidência desta com o aumento da idade dos indivíduos, que também é um dos principais fatores de risco para DA. Com isso, sabe-se que ocorre uma variação de 0,16% entre indivíduos de 65-69 anos de idade a 23,4% em indivíduos acima dos 85 anos (Eratne *et al.*, 2018).

Segundo dados obtidos do Departamento de Informática do SUS (DATASUS), portal oficial do Ministério da Saúde, no Brasil, entre 2013 e 2022, das 14.024 pessoas já internadas pela doença de Alzheimer, 7.721 pertencem a região Sudeste, sendo a mais prevalente entre as cinco, com cerca de 55% das internações registradas. Ainda de acordo com o DATASUS, o gênero feminino apresenta prevalência de 65%. Essa estatística está relacionada ao hormônio folículo-estimulante (FSH) (Xiong *et al.*, 2023). Este, por sua vez, é um hormônio secretado pelas células gonadotróficas, da glândula pituitária anterior. Foi visto que o FSH ativa FSHR (receptores do hormônio folículo-estimulante) no cérebro, deixando as mulheres mais susceptíveis à patologia da DA e, ainda, o bloqueio de FSH melhorou a cognição de ratos com modelo da DA (Xiong *et al.*, 2022). Além disso, outro dado importante observado foi que 58,2% das pessoas analisadas tinham 80 anos ou mais.

Assim, quando se fala da fisiopatologia da DA, desde a década de 90, temos a “hipótese da cascata amilóide”, a qual sugere que a formação de aglomerados tóxicos deve-se à fragmentação da proteína precursora amilóide (PPA) (Santos *et al.*, 2017). A PPA é responsável por diversos processos neurais, como a diferenciação das células nervosas e o desenvolvimento dos neurônios, além de estar localizada nas membranas neuronais, o que a liga diretamente ao processo de formação do peptídeo beta-amilóide ( $\beta$ A) (Ribeiro *et al.*, 2021).

Desse modo, para chegar à formação das placas senis, é preciso entender os processos de clivagem da PPA. Esta clivagem pode ocorrer por duas vias distintas, com três secretases diferentes. Na primeira via, chamada de não amiloidogênica, ocorre uma quebra realizada pela  $\alpha$ -secretase, originando um fragmento denominado C83 (83 aminoácidos) e uma proteína PPA solúvel, com efeitos neurais protetores. O fragmento continua ligado à membrana neural e, posteriormente, sofre uma clivagem pela  $\gamma$ -secretase (Bernhardi, 2005). Logo, a via mediada pela enzima  $\alpha$ -secretase não permite o acúmulo e a formação de placas senis uma vez que o peptídeo final não corresponde à  $\beta$ A (Castro-Álvarez, Cardona-Gómez, 2014).

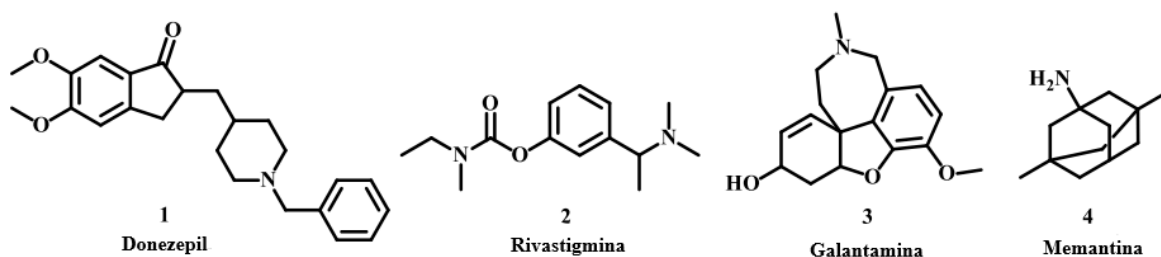
A segunda via de clivagem da PPA, chamada de via amiloidogênica, é quem origina a  $\beta$ A. A quebra da molécula é iniciada pela  $\beta$ -secretase, a qual libera um segmento N-terminal menor e outro C-terminal, contendo 99 aminoácidos, os quais passam por mais uma fragmentação pela  $\gamma$ -secretase, levando a formação do peptídeo  $\beta$ A. (de Paula *et al.*, 2009). Porém, a clivagem do fragmento C99 pode gerar diversas frações com diferentes quantidades de aminoácidos, variando de 40 a 51. Os fragmentos que formam a  $\beta$ A possuem de 40 a 42 aminoácidos (Olsson *et al.*, 2014).

A partir de certas condições, sabe-se que os monômeros de  $\beta$ A, quando liberados em excesso podem agregar-se de diversas formas, como em oligômeros, fibrilas amilóides e protofibrilas, levando a formação de placas (Haass *et al.*, 1992). O excesso de secreção da  $\beta$ A pode ocorrer por um aumento da atividade da enzima  $\beta$ -secretase associado à uma redução da atividade da  $\alpha$ -secretase, favorecendo assim a via amiloidogênica (Klein *et al.*, 2001). A presença de oligômeros e sua consequente agregação em dímeros, trímeros, tetrâmero e pentâmeros, e até estruturas menos solúveis causam dano aos neurônios, promovendo neurotoxicidade, inflamação, estresse oxidativo, perda de sinapses, o que acarreta o principal sintoma da DA, o déficit de memória (Klein *et al.*, 2001).

Por conseguinte, as formas solúveis de  $\beta$ A acabam intensificando a liberação de glutamato pelos neurônios, o que dificulta sua recaptção pelos astrócitos. O glutamato se difunde pelo espaço extra-sináptico, onde existem receptores N-metil-D-aspartato extra-simpáticos (E-NMDA). A ativação destes receptores causa uma hiperfosforilação da proteína TAU, levando à formação de emaranhados neurofibrilares que se acumulam dentro das células e contribuem para a morte neural. Além disso, a ativação dos E-NMDA estimula a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, provocando dano oxidativo. Por outro lado, as formas insolúveis de  $\beta$ A estimulam as células microgliais a liberar citocinas pró-inflamatórias, tal qual o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1-beta (IL-1 $\beta$ ) e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Andrade *et al.*, 2023).

O cenário acima resulta em uma peroxidação lipídica e prejuízo na neurogênese. As células microgliais causam dano neural pela via da mieloperoxidase, que é uma enzima e um biomarcador de infiltração presente nos granulócitos e na microglia. Sua atividade promove a produção de um agente oxidante, o ácido hipocloroso. Com isso, os eventos oxidativos e inflamatórios acabam sendo marcas da neurodegeneração da DA (Zhang *et al.*, 2015).

Atualmente, existem dois grupos principais de fármacos para tratamento da DA, representados estruturalmente na Figura 1, os inibidores de acetilcolinesterase, os quais inibem as enzimas que degradam a acetilcolina (Ach). Assim ocorre maior disponibilidade do neurotransmissor na fenda sináptica, podendo causar melhora nos sintomas cognitivos, sendo indicada para tratar as fases leve e moderada da doença, como donepezil (1), rivastigmina (2) e galantamina (3). E, um antagonista do receptor de NMDA, a memantina (4), usada em fases moderadas (Oliveira *et al.*, 2019). Contudo, tais abordagens terapêuticas acabam não atuando na progressão da doença, já que a DA não possui cura.



**Figura 1:** Estruturas químicas das drogas usadas no tratamento da Doença de Alzheimer.

A memantina (Figura 1, composto 4), por sua vez, é um antagonista não competitivo do receptor NMDA, reduzindo o acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro da célula, o que acaba beneficiando as funções cognitivas do cérebro (Wang *et al.*, 2017; Khoury *et al.*, 2018). No entanto, este fármaco pode induzir diversos efeitos colaterais, como alucinações, confusão, dores de cabeça, tontura, pressão alta, sonolência e inquietação (Shafiei-Iran Nejad *et al.*, 2021). Apesar de muito utilizada nos tratamentos de casos mais moderados da DA, a memantina não previne danos neurais permanentes em animais submetidos à injeção intracerebroventricular de oligômeros de beta-amilóide (Figueiredo *et al.*, 2013). Além disso, seus efeitos clínicos são reduzidos conforme a progressão da doença (Reisberg *et al.*, 2003).

Sabe-se que os oligômeros de  $\beta\text{A}$  podem ser de alto ou baixo peso molecular. A partir disso, por estudo de Figueiredo e colaboradores (2013), foi analisado que os oligômeros de baixo peso molecular causam dano neuronal persistente, ao reduzir a quantidade de sinapses no hipocampo e, também, há indícios de que afetam a plasticidade neural, prejudicando a memória. Já os oligômeros de alto peso molecular, prejudicam a memória de maneira transitória, não progredindo ao longo do tempo. Com isso em perspectiva, foi visto que a memantina consegue reverter o dano cognitivo transitório dos oligômeros de alto peso molecular, porém, não previne a perda de memória induzida pelos oligômeros de baixo peso molecular. Isso indica que este fármaco não é capaz de prevenir dano neural persistente e, conseqüentemente, interromper a progressão da DA, diminuindo sua eficácia clínica (Reisberg *et al.*, 2003).

Devido ao fato de que os fármacos atuais possuem uma eficácia clínica reduzida a longo prazo, faz-se necessária a busca por novas alternativas de tratamento para a DA. A inflamação é um ponto chave e muito característico da doença, contribuindo para os danos neurais. Desse modo, modificar as vias inflamatórias pode ser uma alternativa terapêutica

(Turgutalp *et al.*, 2024). Estudos sobre os inibidores de tirosina-quinase como nilotinibe, dasatinibe e imatinibe, entre outros, produziram efeitos que modificam a doença em ensaios clínicos, ao aliviar a inflamação. O dasatinibe, por sua vez, conseguiu obter um resgate significativo da fosforilação de TAU, da neuroinflamação e da secreção de  $\beta$ A (Jackson *et al.*, 2021).

Atualmente, foi desenvolvida uma geração de novos compostos para tratamento da DA, que corresponde aos anticorpos monoclonais anti- $\beta$ A (Cehlar *et al.*, 2018; Kozin *et al.*, 2018). Tais anticorpos possuem como principal mecanismo a ligação com sítios específicos de oligômeros de  $\beta$ A, com o intuito de atrair células de defesa e aumentar a remoção desses oligômeros. De fato, o estudo de Sevigny e colaboradores de 2016 demonstrou que o aducanumab, primeiro anticorpo monoclonal anti- $\beta$ A a ser descrito, foi capaz de reduzir a carga amilóide de pacientes com DA após 54 semanas de tratamento. Além disso, houve lentificação do prejuízo cognitivo dos indivíduos testados em relação ao grupo placebo (Sevigny *et al.*, 2016). Entretanto, no mesmo trabalho foram descritos efeitos colaterais associados ao aducanumab, tais como as anormalidades em exames de imagem, tais como micro-hemorragia e edema. Em 2024, o uso de aducanumabe (Aduhelm®) foi descontinuado (<https://edition.cnn.com/2024/01/31/health/aduhelm-alzheimers-biogen/index.html>).

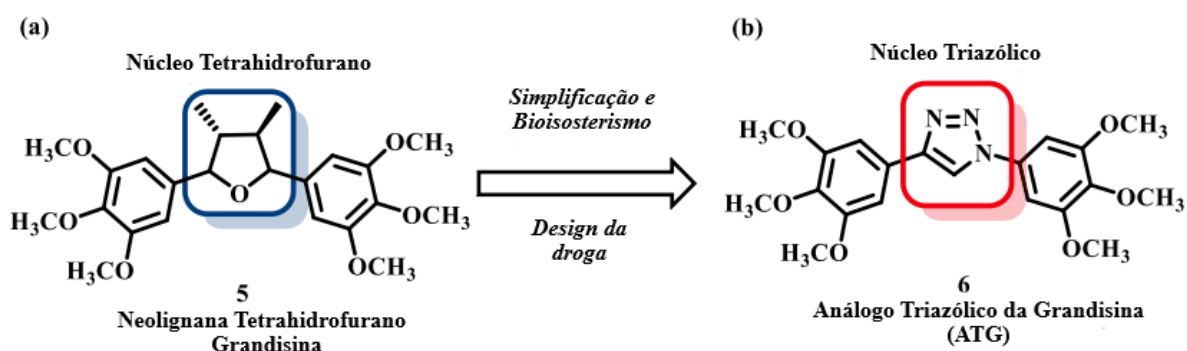
Portanto, apesar de ser promissor, o uso de anticorpos apresentou efeitos tóxicos importantes, além de serem fármacos de alto custo. Conseqüentemente, ainda existe a necessidade da busca por novos compostos com atividade neuroprotetora e que apresentem níveis de segurança adequados.

Neste contexto, outras estratégias estão sendo utilizadas para a produção de novas drogas multi-alvo, como o bioisosterismo. Este, por sua vez, consiste em uma técnica de modificação molecular de substâncias, focado na alteração de átomos ou grupos químicos semelhantes de forma espacial e eletrônica. Após esse processo, é possível obter análogos estruturais a partir de moléculas bioativas, com atividade biológica semelhantes ou melhores do que os compostos originais, mas com algumas propriedades diferentes, como solubilidade e especificidade (Filho, 2002). Com base nisso, no laboratório de química farmacêutica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) foi sintetizado por bioisosterismo um análogo triazólico da grandisina (ATG), no qual seu núcleo tetrahydrofurano foi substituído por um anel triazólico (Figura 2). A grandisina é um produto natural extraído da planta *Virola surinamensis*. Zhai e colaboradores em 2005 mostraram que neolignananas possuem efeito

neuroprotetor in vitro contra oligômeros de  $\beta$ A (Zhai *et al.*, 2005). Um estudo prévio demonstrou que este composto apresenta efeitos anti-inflamatórios em modelo de edema de pata e edema de orelha em camundongos (Figueiredo *et al.*, 2013). Tais dados sugeriram que neolignanas possuem potencial neuroprotetor em modelos animais da DA.

Adicionalmente, dados da literatura demonstram que o ATG apresentou maior potência em ensaios antileishmania in vitro do que o composto original (COSTA *et al.*, 2016).

**Figura 2:** Estrutura química da neolignana grandisina (5) de tetrahydrofurano e do análogo triazólico de grandisina (TGA).



Diante do que foi exposto, é visto que a DA possui mecanismos inflamatórios e oxidativos conhecidos, o que causa a morte neural progressiva. Também, com o conhecimento sobre as neolignanas e seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e neuroprotetores, podemos hipotetizar que o ATG consiga reduzir os efeitos deletérios de oligômeros da  $\beta$ A. Dados não publicados mostram que o ATG tem uma lipossolubilidade adequada ( $\text{LogP} = 2,80$ ) e se encaixa em outros parâmetros da Regra dos Cinco de Lipinski, o que é coerente com outros compostos que são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e alcançar o SNC. Portanto, este estudo objetivou a avaliação dos efeitos neuroprotetores persistentes do AGT em um modelo animal da DA.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivos Gerais

Analisar os efeitos agudos e tardios do tratamento repetido com um análogo triazólico da grandisina (ATG), em camundongos submetidos ao modelo da Doença de Alzheimer.

### **3.2. Objetivos Específicos**

- 3.2.1.** Avaliar o efeito do tratamento repetido com ATG e memantina, 8 (oito) e 16 (dezesesseis) dias após a injeção de intracerebroventricular de oligômeros da  $\beta$ A, utilizando a MEM como controle positivo.
- 3.2.2.** Avaliar o efeito do tratamento repetido sobre o nível de lipoperoxidação no córtex e no hipocampo dos animais tratados com a memantina e ATG.
- 3.2.3.** Mensurar o conteúdo de citocinas inflamatórias, o fator de necrose tumoral (TNF), interferon (IFN) e IL-6, no hipocampo de animais que foram submetidos ao tratamento com memantina e ATG.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Animais**

Foram utilizados camundongos C57/Bl6 de 3 meses de idade. Os animais foram mantidos com água e comida *ad libitum* em sala com temperatura controlada. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (protocolo 1.129/2020). Eles foram fornecidos pelo Biotério Central da UFMS.

### **4.2. Preparação dos oligômeros da proteína $\beta$ A fracionados**

Os oligômeros foram preparados a partir do peptídeo sintético  $\beta$ A1-42 (California Peptides). O peptídeo foi solubilizado em hexafluoroisopropanol e o solvente foi evaporado para produzir filmes secos, os quais foram subsequentemente dissolvidos em dimetilsulfóxido estéril e anidro para fazer uma solução de 5 mM. Essa solução foi dissolvida à 100  $\mu$ M em PBS incubada por 16 horas à 4°C. A preparação foi então centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C para a remoção de protofibrilas e fibrilas insolúveis. O sobrenadante contendo oligômeros solúveis da  $\beta$ A (O $\beta$ A) foi estocado a 4°C. A concentração dos O $\beta$ A foi mensurada pelo ELISA (LIU MY et al., 2014).

### **4.3. Injeção intracerebroventricular de oligômeros da $\beta$ A**

Para injeção intracerebroventricular de  $\beta$ A, os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal (i.p.) com cetamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) em volume de aplicação de 1 mg/kg. As coordenadas estereotáxicas para implante unilateral de cânula guia no ventrículo esquerdo estão descritas no trabalho de Diniz e colaboradores (2017) (LANE RM



et al., 2006). O volume final de injeção foi de 2  $\mu$ L, sendo utilizada uma seringa Hamilton com capacidade de 10  $\mu$ L (FIGUEIREDO et al., 2013).

#### **4.4. Tratamento farmacológico**

O análogo trazólico da grandisina (ATG) foi sintetizada no Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sob supervisão do Professor Dr. Adriano César de Moraes Baroni. Os animais receberam uma injeção por via intraperitoneal (i.p.), uma vez ao dia durante 14 dias, sendo iniciado 24 horas após a estereotaxia. Os camundongos foram distribuídos em quatro grupos experimentais: (1) Veículo (i.c.v.)-veículo (i.p.); (2) A $\beta$  (i.c.v.)-Molécula ATG; (3) A $\beta$  (i.c.v.)-veículo (i.p.) e (4) A $\beta$  (i.c.v.)-Memantina (i.p.). A molécula ATG foi testada na dose de 1 mg/kg (ADRYANO A. V. CARVALHO et al., 2010). A memantina foi utilizada como um controle positivo e foi administrada na dose de 10 mg/kg (Figueiredo et al., 2013).

#### **4.5. Teste de reconhecimento de objeto (TRO)**

O TRO foi realizado segundo metodologia descrita por Figueiredo e colaboradores, 2013 (FIGUEIREDO et al., 2013). Assim sendo, os animais foram colocados individualmente em uma arena circular de acrílico para a sessão de habituação (t0). Vinte e quatro horas depois, os animais foram recolocados na mesma arena com dois objetos idênticos dispostos simetricamente, sendo medido o tempo de exploração de cada um deles (sessão de aquisição – t1). Um dia depois, os camundongos foram novamente colocados na arena, sendo que um dos objetos utilizados no t1 foi substituído por um objeto novo (sessão de retenção- t2). O tempo total de cada uma das sessões foi de 5 minutos. O índice de discriminação foi utilizado para analisar o tempo de exploração entre o objeto novo e o familiar. Este índice é calculado pela diferença entre a exploração do objeto familiar (TF) e o novo (TN) dividido pelo tempo de exploração total do objeto novo e familiar [DI= (TN – TF) / (TN + TF)]. Para avaliação dos efeitos agudos e tardios do tratamento com ATG e MEM, o TRO foi realizado duas vezes, de modo que as sessões de retenção de memória (t2) coincidiram com o 8° e 16° dias após a injeção de  $\beta$ A.

#### **4.6. Perfil Oxidativo**

Após o TRO, os animais foram eutanasiados, decapitados e o córtex e hipocampo foram dissecados para as análises moleculares. Para medidas do perfil oxidativo foi determinado o conteúdo das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (*thiobarbituric acid reagent species* -TBARS), onde aproximadamente 95% destas,

correspondem ao malondialdeído - MDA, produto majoritário da peroxidação lipídica (9), no córtex e hipocampo dos animais (Bird e Draper, 1984). Os resultados foram normalizados de acordo com o conteúdo de proteínas obtidas nas amostras pelo método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovino (Sigma®) para calcular a concentração de proteína nas amostras.

#### **4.7. Dosagem de citocinas**

O fator de necrose tumoral (TNF), interferon (IFN) e IL-6 foram quantificados no hipocampo dos animais através de citometria de fluxo (CytoFLEX, Beckman Coulter, EUA) usando imunoglobulina de camundongos no ensaio Cytometric Bead Array (CBA, BD Biosciences) de acordo com as recomendações do fabricante. Os softwares Flowjo V10.8 (BD) e GraphPad Prism v.8 foram utilizados para análise. Os resultados foram expressos em pg/mL, baseados em curvas padrões.

#### **4.8. Análise estatística**

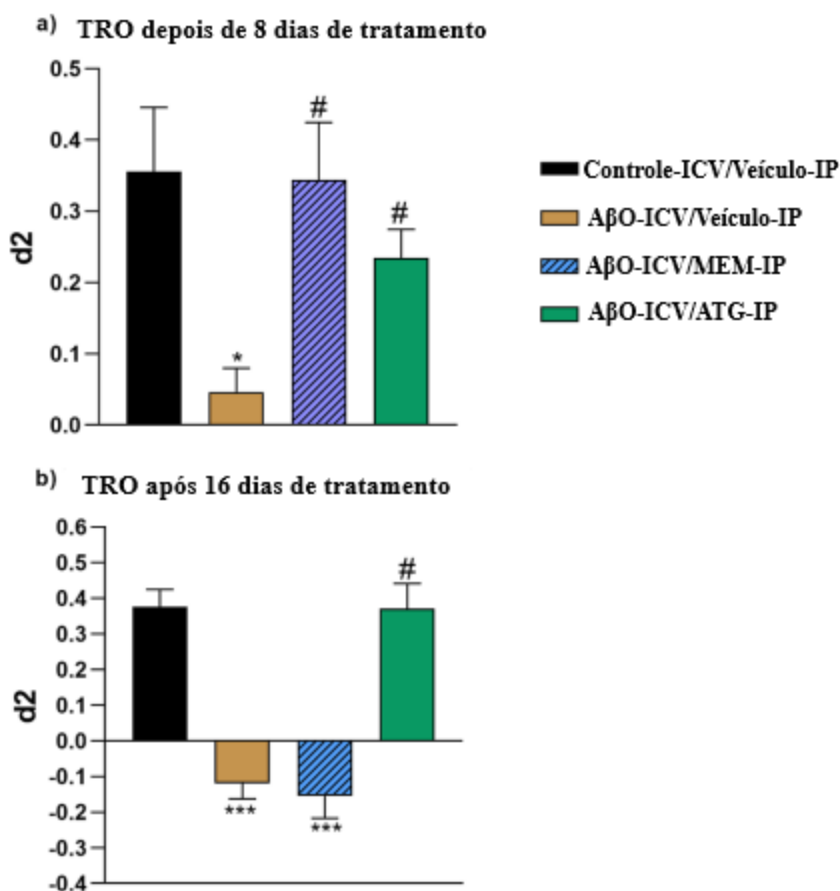
A análise estatística dos dados foi realizada usando ANOVA, para comparação pareada entre os grupos em relação ao controle, admitindo um nível mínimo de significância de  $p < 0,05$ . O software utilizado foi o GraphPad Prism versão 5.0.

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1 O ATG, mas não a MEM, previne o prejuízo cognitivo persistente induzido pela injeção de oligômeros de $\beta$ A.**

Após 8 dias da injeção de  $\beta$ A, houve uma queda acentuada do índice d2 no grupo  $\beta$ A (i.c.v.) – Veículo (i.p.) ( $d2 = 0,04 \pm 0,03$ ) em comparação com o grupo controle (i.c.v.)-veículo (i.p.) ( $d2 = 0,35 \pm 0,09$ ;  $p < 0,05$ ,  $F_{3,25} = 3,65$ ). O grupo tratado com MEM apresentou valores de índice d2 ( $0,34 \pm 0,08$ ,  $p > 0,05$ ) próximos ao grupo controle (i.c.v.)-veículo (i.p.) ( $d2 = 0,35 \pm 0,09$ ), demonstrando que a droga preveniu o prejuízo cognitivo induzido por  $\beta$ A após 8 dias da injeção. Igualmente, o ATG preveniu o comprometimento da memória de reconhecimento no mesmo ponto temporal ( $\beta$ A-i.c.v./ATG-i.p.,  $d2 = 0,23 \pm 0,04$ ,  $p > 0,05$ ) em comparação com o grupo controle (Figura 3a).

**Figura 3:** Índice de discriminação (d2) em uma tarefa de reconhecimento de objeto novo (NORT).

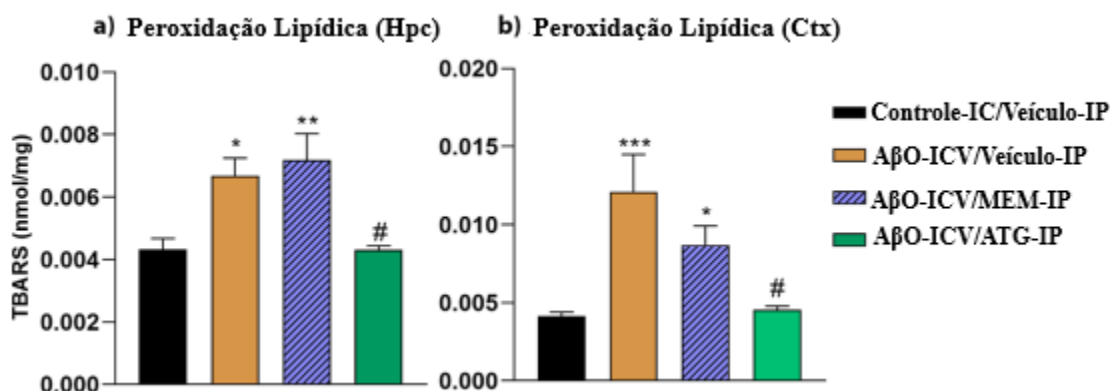


(a) Aos 7 dias de tratamento, o grupo  $\beta$ A-ICV/veículo-IP apresentou comprometimento da memória em comparação com o grupo controle-ICV/veículo-IP. Tanto a memantina (MEM) quanto o análogo triazólico de grandisina (ATG) preveniram o déficit de memória induzido por  $\beta$ A. (b) Aos 14 dias de tratamento, a MEM não conseguiu prevenir o comprometimento persistente da memória, enquanto o ATG foi capaz de prevenir o déficit de memória induzido por  $\beta$ A. Os grupos experimentais foram os seguintes: injeção intracerebroventricular (ICV) controle/injeção intraperitoneal (IP) veículo, n = 7;  $\beta$ A-ICV/veículo-IP, n = 8;  $\beta$ A-ICV/MEM-IP, n = 7;  $\beta$ A-ICV/ATG-IP, n = 7. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001, e #p > 0,05 em comparação com o grupo controle-ICV/veículo-IP (Andrade *et al.*, 2023).

Após o 16º dia da injeção de  $\beta$ A do grupo  $\beta$ A-i.c.v./veículo-i.p. apresentaram comprometimento significativo da memória ( $d_2 = -0,12 \pm 0,04$ ; p < 0,001,  $F_{2,25} = 27,09$ ). Além disso, a memantina não foi capaz de prevenir a diminuição de  $d_2$  ( $d_2 = -0,15 \pm 0,06$ , p < 0,001), demonstrando perda de eficácia em prevenir o prejuízo persistente de memória. Curiosamente, o ATG preveniu o déficit de reconhecimento da memória após 16 dias da injeção de A $\beta$  (A $\beta$ O-i.c.v./TGA-i.p.,  $d_2 = 0,37 \pm 0,07$ , p > 0,05) demonstrando valores de índice  $d_2$  próximos ao grupo controle-i.c.v.- veículo-i.p. ( $0,37 \pm 0,05$ , p > 0,05), sugerindo que o composto teste induziu efeitos neuroprotetores persistentes no modelo usado (Figura 3b).

## 5.2 O tratamento com ATG, mas não com a MEM previne a lipoperoxidação no córtex e hipocampo dos animais após 16 da injeção de A $\beta$ O.

**Figura 4:** Peroxidação lipídica (TBARS, nmol/mg) no (a) hipocampo (Hpc) e (b) córtex (Ctx) de camundongos injetados com  $\beta$ A e camundongos controle tratados com veículo, memantina (MEM) ou análogo triazólico de grandisina (ATG).



$\beta$ A promoveu peroxidação lipídica em ambas as áreas em comparação com o tratamento controle-ICV/veículo-IP. O ATG preveniu a lipoperoxidação, e a MEM não exerceu efeitos antioxidantes. Os grupos experimentais foram os seguintes: injeção intracerebroventricular (ICV) controle/injeção intraperitoneal (IP) veículo, n = 7;  $\beta$ A-ICV/veículo-IP, n = 8;  $\beta$ A-ICV/MEM-IP, n = 7; e  $\beta$ A-ICV/ATG-IP, n = 7. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , e # $p > 0,05$  em comparação com o grupo controle-ICV/veículo-IP (Andrade *et al.*, 2023).

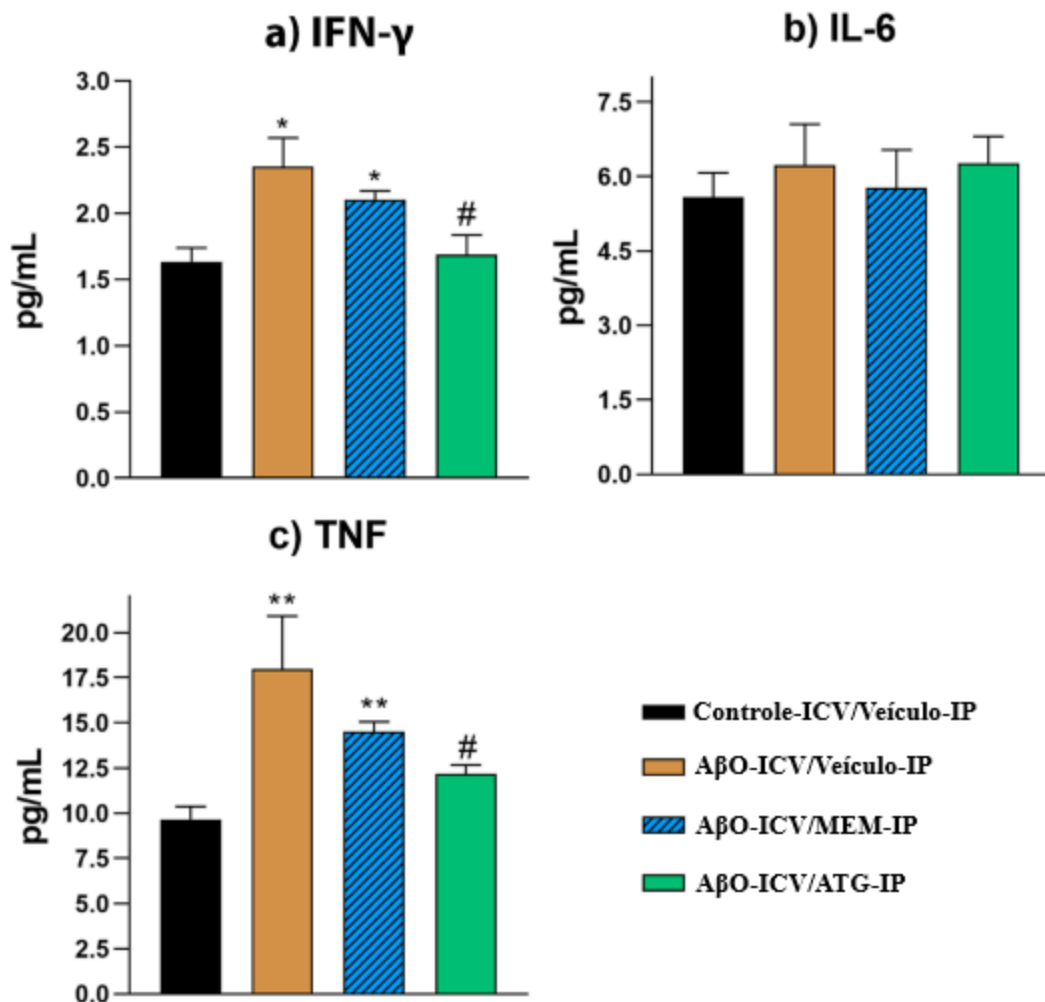
Os níveis de TBARS foram usados para comparar os efeitos do ATG e da MEM quanto à lipoperoxidação no cérebro dos animais que receberam O $\beta$ A. Como esperado, o grupo A $\beta$ O-i.c.v./veículo-i.p. (TBARS = 0,007  $\pm$  0,0006 nmol/mg) apresentou um aumento substancial em marcadores pró-oxidativos no hipocampo em comparação com o grupo controle (controle-ICV/veículo-IP, TBARS = 0,004  $\pm$  0,0004 nmol/mg;  $p < 0,05$ ,  $F_{3,26} = 7,90$ ). Como observado no grupo A $\beta$ O-i.c.v./MEM-i.p., TBARS = 0,007  $\pm$  0,9 nmol/mg, a memantina não conseguiu prevenir a lipoperoxidação em comparação com o controle (controle-ICV/veículo-IP, TBARS = 0,004  $\pm$  0,0004 nmol/mg,  $p < 0,01$ ). O ATG preveniu um aumento nos TBARS no hipocampo (A $\beta$ O-ICV/ATG-IP, TBARS = 0,004  $\pm$  0,0004 nmol/mg), resultando em nenhuma diferença entre os grupos com o grupo controle(i.c.v.)-veículo (i.p.) ( $p > 0,05$ ) (Figura 4a).

No córtex, A $\beta$ O aumentou significativamente o dano oxidativo (A $\beta$ O-i.c.v./veículo-i.p., TBARS = 0,012  $\pm$  0,002 nmol/mg;  $p < 0,001$ ,  $F_{3,26} = 9,84$ ) em comparação com o controle-i.c.v./veículo-i.p. (TBARS = 0,004  $\pm$  0,0003 nmol/mg). A memantina não conseguiu prevenir a lipoperoxidação induzida por A $\beta$ O

(A $\beta$ O-i.c.v./MEM-i.p., TBARS = 0,009  $\pm$  0,001 nmol/mg, p < 0,05) em comparação com o controle (p < 0,05). Ainda, pode se observar que o ATG (A $\beta$ O-ICV/ATG-IP, TBARS = 0,004  $\pm$  0,0003 nmol/mg) preveniu efetivamente um aumento nos TBARS, resultando em nenhuma diferença em relação ao controle-i.c.v./veículo-i.p. (p > 0,05) (Figura 4b)

### 5.3 O ATG, mas não a MEM, reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo de camundongos injetados com A $\beta$ O.

**Figura 5:** Concentrações de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo de camundongos.



(a) Os níveis de IFN- $\gamma$  foram significativamente aumentados pela injeção de  $\beta$ A em comparação com o controle. A memantina (MEM) não conseguiu inibir o aumento de IFN- $\gamma$ , enquanto o análogo triazólico de grandisina (ATG) preveniu seu aumento. (b)  $\beta$ A não modificou os níveis de IL-6 em comparação com o controle (p > 0,05), resultando em diferenças não significativas entre  $\beta$ A-ICV/MEM-IP e  $\beta$ A-ICV/ATG-IP em relação ao controle. (c)  $\beta$ A aumentou os níveis de TNF. A MEM não preveniu o aumento de TNF, enquanto os animais tratados com ATG apresentaram níveis de TNF comparáveis aos do grupo controle. Os grupos experimentais foram os seguintes: injeção intracerebroventricular (ICV) controle/injeção intraperitoneal (IP) veículo, n = 7;  $\beta$ A-ICV/veículo-IP, n = 8;  $\beta$ A-ICV/MEM-IP, n = 7; e  $\beta$ A-ICV/ATG-IP, n = 7. Os valores estão expressos como

média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , e # $p > 0,05$  em comparação com o grupo controle-ICV/veículo-IP (Andrade *et al.*, 2023).

Além do estresse oxidativo, ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IFN- $\gamma$  e IL-6 em estruturas afetadas pela  $\beta$ A. Essa liberação acaba criando um ambiente neurotóxico no cérebro, causando dano e morte neuronal (62). Foi feita uma estimativa das concentrações de IFN- $\gamma$ , TNF e IL-6 no hipocampo de camundongos. Neste estudo, os seguintes grupos experimentais foram utilizados: a, controle-i.c.v./veículo-i.p.; b, A $\beta$ O-i.c.v./veículo-i.p.; c, A $\beta$ O-i.c.v./MEM-i.p. (controle positivo); e d, A $\beta$ O-i.c.v./ATG-i.p.

A $\beta$ O aumentou efetivamente os níveis de IFN- $\gamma$  no grupo b (A $\beta$ O-i.c.v./veículo-i.p.=  $2,35 \pm 0,22$  pg/mL;  $p < 0,05$ ,  $F_{2,23} = 5,55$ ) em comparação com o controle (controle-ICV/veículo-IP,  $1,63 \pm 0,11$  pg/mL). A memantina (A $\beta$ O-i.c.v./MEM-i.p.,  $2,10 \pm 0,07$  pg/mL) não conseguiu inibir o aumento de IFN- $\gamma$  em comparação com o controle ( $p < 0,05$ ). Curiosamente, no grupo d, o TGA (A $\beta$ O-ICV/TGA-IP,  $1,82 \pm 0,14$  pg/mL) manteve os níveis de IFN- $\gamma$ , próximos do controle ( $p > 0,05$ ) (Figura 5a).

A injeção de A $\beta$ O (A $\beta$ O-i.c.v./veículo-i.p.,  $6,67 \pm 0,61$  pg/mL) não resultou em diferenças na concentração de IL-6 ( $p > 0,05$ ,  $F_{3,23} = 1,52$ ) em relação ao controle ( $5,59 \pm 0,20$  pg/mL). Assim, os níveis de IL-6 não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ) entre o controle e a memantina (A $\beta$ O-ICV/MEM-IP,  $5,56 \pm 0,27$  pg/mL) ou os camundongos tratados com TGA (A $\beta$ O-ICV/TGA-IP,  $6,27 \pm 0,22$  pg/mL) (Figura 5b).

A $\beta$ O aumentou ( $p < 0,01$ ,  $F_{3,23} = 5,20$ ) a concentração de TNF no hipocampo (A $\beta$ O-i.c.v./veículo-i.p.,  $17,97 \pm 2,93$  pg/mL) em comparação com o controle (controle-i.c.v./veículo-i.p.,  $9,64 \pm 0,73$  pg/mL). A memantina não preveniu um aumento no nível de TNF (A $\beta$ O-ICV/MEM-IP=  $13,51 \pm 0,32$ ;  $p < 0,01$ ) em comparação com o controle. No entanto, o TGA inibiu a elevação do nível de TNF (A $\beta$ O-ICV/ATG-IP=  $12,16 \pm 0,50$  pg/mL,  $p > 0,05$ ) em comparação com o tratamento controle.

## 6. DISCUSSÃO

Sabe-se que a fisiopatologia da DA é caracterizada por alterações estruturais e bioquímicas no cérebro, provenientes do acúmulo das placas amiloides, interferindo na comunicação sináptica e levando ao dano neuronal (Selkoe, 2001). No presente estudo, foi possível demonstrar que a injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de oligômeros de  $\beta$ A induziram prejuízo cognitivo e perda de memória no modelo animal de DA. Essa questão tem

grande relevância, pois o teste de memória proposto no TRO recruta o córtex e o hipocampo dos camundongos, que são afetados pela doença em humanos. Não obstante, os animais que receberam A $\beta$  apresentaram valores de TBARS em ambas regiões, o que confirma o estresse oxidativo induzido por A $\beta$ .

Com o mesmo intuito, foi medida a atividade de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo dos animais. A elevação da IL-6 está associada a quadros de inflamação crônica e processos autoimunes (Jones *et al.*, 2018). Essa expressão excessiva está relacionada ao déficit cognitivo da patologia da DA (Lyra *et al.*, 2021). Contudo, os animais que foram tratados com memantina e com ATG não modificaram a presença de IL-6 de maneira significativa, quando comparados ao grupo controle (Figura 5, gráfico b).

O IFN- $\gamma$  promove dano neuronal progressivo, a partir do recrutamento excessivo de micróglia e astrócitos para a inflamação gerada na DA. Com isso, ocorre o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, assim como outros mediadores de citotoxicidade (Mietelska e Wojda, 2017). Assim, no presente estudo, os níveis de IFN- $\gamma$  no grupo b aumentaram quando comparados ao grupo controle (Figura 5, gráfico b). A memantina, por sua vez, não inibiu o aumento desta citocina quando comparada ao controle. Já o ATG conseguiu manter os níveis de IFN- $\gamma$  em valores semelhantes do grupo controle.

A citocina TNF auxilia no processo de necropsia neuronal, uma vez que modula a funcionalidade da micróglia, e a deixa em uma forma ativa na presença de placas amiloides (Ren *et al.*, 2021). No hipocampo dos animais estudados, a quantidade de TNF aumentou quando comparado ao controle, indicando dano cerebral. A memantina não foi capaz de prevenir seu aumento. Porém, o ATG obteve sucesso na inibição do aumento desta citocina pró-inflamatória.

Esses resultados sugerem que o ATG possui efeito anti-inflamatório no hipocampo dos animais com DA. Provavelmente está ligado à redução da ativação da micróglia, as quais são a primeira linha de defesa do cérebro (Andrade *et al.*, 2023). Além disso, em estudos prévios foi demonstrado que a citocina IL-6 atua no hipocampo de animais transgênicos que expressam  $\beta$ A com três (3) meses de vida, segundo Khodadadi e colegas (2021), sugerindo que pode ser uma citocina que leve mais tempo para ser liberada no contexto da DA.

Através dos resultados do presente estudo é possível observar que a MEM apresenta efeitos protetores agudos sobre a memória de reconhecimento dos animais, porém perde a eficácia após 16 dias da injeção de  $\beta$ A (Figuras 3, 4 e 5). É provável que essa diferença esteja

ligada ao tempo de meia vida de cada fármaco, sendo o do ATG maior que o da memantina. Esta, inclusive, de acordo com estudos, apresenta meia-vida de, no máximo, 4 horas em camundongos. Entretanto, no estudo atual, os animais pararam de receber os tratamentos dois dias antes da realização da sessão de T2, que foi realizada 16 dias após a administração dos oligômeros. Neste momento é possível que os níveis de ATG estivessem diminuídos no momento de realização do T2. Porém, o efeito do ATG neste momento foi preservado. Com isso, podemos ver que a memantina não conseguiu manter um efeito neuroprotetor persistente, ao contrário do ATG, que mesmo dois dias depois do fim da administração, ainda atuava nas citocinas do hipocampo dos animais.

Figueiredo e colaboradores em 2013 mostraram que oligômeros de alto peso molecular induzem um efeito neurotóxico transitório em camundongos que receberam injeção i.c.v. destes peptídeos. Estes animais recuperaram a atividade cognitiva 7 dias após a injeção. Por outro lado, os oligômeros de baixo peso molecular causam danos persistentes sobre a cognição, prejudicando a plasticidade sináptica, visto que mesmo 14 dias após da injeção, os animais apresentavam prejuízo de memória (Figueiredo *et al*, 2013). Baseado nisso, pode-se sugerir que o ATG é capaz de prevenir o dano persistente de memória induzido por oligômeros de alto peso molecular, visto que mantém seu efeito 8 e 16 dias após a injeção, o que é diferente da MEM que carece de efeitos neuroprotetores mais tardiamente. Tais dados sugerem também que a droga experimental ATG possui efeitos inovadores sobre a neuroproteção frente a uma fármaco clínica, no modelo utilizado.

## 7. CONCLUSÃO

Esses resultados sugerem que o ATG possui efeitos neuroprotetores persistentes, ao diminuir o estresse oxidativo no córtex e no hipocampo, bem como os valores de citocinas dos animais submetidos ao modelo da doença de Alzheimer, mostrando-se como uma droga com perfil inovador quando comparada à MEM no modelo de DA utilizado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Eratne, D., Loi, S. M., Farrand, S., Kelso, W., Velakoulis, D., & Looi, J. C. (2018). **Alzheimer's disease: clinical update on epidemiology, pathophysiology and diagnosis. Australasian**



psychiatry: bulletin of Royal Australian and New Zealand College of Psychiatrists, 26(4), 347–357. <https://doi.org/10.1177/1039856218762308> Acesso em: 02/09/2024.

ABREU, Aline Daniele de Almeida; SOUZA, Thifisson Ribeiro de; LEÃO, Sílvia Menezes; SILVA, Simone Soares da; DELTREGGIA, Fabio. **DOENÇA DE ALZHEIMER: UMA CONDIÇÃO NEURODEGENERATIVA PROGRESSIVA QUE ATINGE MILHÕES DE PESSOAS NO MUNDO**. Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1014–1021, 2024. DOI: 10.51891/rease.v10i1.12996. Disponível em: <https://periodicorease.pro.br/rease/article/view/12996>. Acesso em: 02/09/2024.

SANTOS, A.; FRAGA, V.; MAGALHÃES, C.; SOUZA, L.; Gomes, K. **Doença de alzheimer e diabetes mellitus tipo 2: qual a relação?** Revista Brasileira de Neurologia, v. 53, n. 4, p.17–26, out - dez. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.46979/rbn.v53i4.1463>. Acesso em: 18/09/2024.

RIBEIRO, H. F.; DOS SANTOS, J. S. F; DE SOUZA, J. N. **Doença de Alzheimer de início precoce (DAIP): características neuropatológicas e variantes genéticas associadas**. Rev Neuropsiquiatra, Lima, v. 84, n. 2, p. 113-127, abr. 2021. Disponível em: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-85972021000200113&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-85972021000200113&lng=es&nrm=iso). Acesso em: 18/09/2024.

BERNHARDI, R. **Mecanismos neurobiológicos de la enfermedad de Alzheimer**. Rev Chil Neuro - Psiquiat, Santiago, v. 43, n. 2, p. 123 - 132. jun. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4067/S071792272005000200005>. Acesso em: 18/09/2024.

CASTRO - ÁLVAREZ, J. F.; CARDONA - GÓMEZ, G. P. **Nuevas aproximaciones para la comprensión de la enfermedad de Alzheimer**. Medicina & Laboratorio, v. 20, p. 337–355, jul. 2014. Disponível em: <https://medicinaylaboratorio.com/index.php/myl/article/view/182>. Acesso em: 18/09/2024.

DE PAULA, V. DE J. R.; GUIMARÃES, F. M.; DINIZ, B.S.; FORLENZA, O. V. **Neurobiological**

**pathways to Alzheimer's disease: Amyloid - beta, TAU protein or both?. Dementia & Neuropsychologia**, v. 3, n.3, p.188 - 194, set. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1980-57642009DN30300003>. Acesso em: 18/09/2024.

OLSSON, F. et al. **Characterization of intermediate steps in amyloid beta (A $\beta$ ) production under near-native conditions**. Journal of Biological Chemistry, v. 289, n. 3, p. 1540–1550, 2014. Acesso em: 18/09/2024.

HAASS, C. et al. **Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism** [see comments]. nature, v. 359, n. 6393, p. 322–325, 1992. Acesso em: 18/09/2024.

KLEIN, W. L.; KRAFFT, G. A.; FINCH, C. E. **Targeting small A  $\beta$  oligomers: The solution to an Alzheimer's disease conundrum?**Trends in Neurosciences, 2001. Acesso em: 18/09/2024.

**Neuroprotective Profile of Triazole Grandisin Analogue against Amyloid-Beta Oligomer-Induced Cognitive Impairment** Victor H. B. de Andrade, Erick Y. M. Rodrigues, Nayara A. F. Dias, Gabriela F. C. Ferreira, Diego B. de Carvalho, Amarith R. das Neves, Paola M. V. Coronel, Murilo K. A. Yonekawa, Eduardo B. Parisotto, Edson A. dos Santos, Albert S. Souza, Edgar J. Paredes-Gamero, Kamylla S. de Sousa, Letícia L. de Souza, Leonardo B. M. Resstel, Adriano C. M. Baroni, and Davi C. Lagatta ACS Chemical Neuroscience 2023 14 (24), 4298-4310  
DOI: 10.1021/acschemneuro.3c00443 Acesso em: 18/09/2024.

Zhang, F.; Jiang, L. **Neuroinflammation in Alzheimer 's Disease**. Neuropsychiatr. Dis. Treat. 2015, 11, 243–256. Acesso em: 08/10/2024.

Wang, Y.; Shi, Y.; Wei, H. **Calcium Dysregulation in Alzheimer 's Disease: A Target for New Drug Development**. J. Alzheimer 's Dis. Parkinsonism 2017, 7 (5), 374. Acesso em: 08/10/2024.

Khoury, R.; Grysman, N.; Gold, J.; Patel, K.; Grossberg, G. T. **The Role of 5 HT6-Receptor Antagonists in Alzheimer's Disease: An Update**. *Expert Opin. Invest. Drugs* 2018, 27 (6), 523–533. Acesso em: 08/10/2024.

Figueiredo, C. P.; Clarke, J. R.; Ledo, J. H.; Ribeiro, F. C.; Costa, C. V.; Melo, H. M.; Mota-Sales, A. P.; Saraiva, L. M.; Klein, W. L.; Sebollela, A.; De Felice, F. G.; Ferreira, S. T. **Memantine Rescues Transient Cognitive Impairment Caused by High-Molecular-Weight A $\beta$  Oligomers but Not the Persistent Impairment Induced by Low Molecular-Weight Oligomers**. *J. Neurosci.* 2013, 33 (23), 9626–9634. Acesso em: 08/10/2024.

Shafiei-Irannejad V, Abbaszadeh S., Janssen PML, Soraya H.. **Memantine and its benefits for cancer, cardiovascular and neurological disorders**. *Eur J Pharmacol* 2021; 910 : 174455. doi:10.1016/j.ejphar.2021.174455 Acesso em: 08/10/2024.

Turgutalp B, Kizil C. **Multi-target drugs for Alzheimer 's disease**. *Trends Pharmacol Sci.* 2024 Jul;45(7):628-638. doi: 10.1016/j.tips.2024.05.005. Epub 2024 Jun 9. PMID: 38853102. Acesso em: 06/11/2024.

Zhu, Y., Tchkonina, T., Pirtskhalava, T., Gower, A.C., Ding, H., Giorgadze, N., Palmer, A.K., Ikeno, Y., Hubbard, G.B., Lenburg, M., O'Hara, S.P., LaRusso, N.F., Miller, J.D., Roos, C.M., Verzosa, G.C., LeBrasseur, N.K., Wren, J.D., Farr, J.N., Khosla, S., Stout, M.B., McGowan, S.J., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Gurkar, A.U., Zhao, J., Colangelo, D., Dorronsoro, A., Ling, Y.Y., Barghouthy, A.S., Navarro, D.C., Sano, T., Robbins, P.D., Niedernhofer, L.J. and Kirkland, J.L. (2015), **The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs**. *Aging Cell*, 14: 644-658. <https://doi.org/10.1111/accel.12344> Acesso em: 06/11/2024.

Roberts, Jackson A., Varma Vijay R., An, Yang., Varma, Sudhir., Candia, Julián., Fantoni, Giovanna., Tiwari, Vinod., Anerillas, Carlos., Williamson, Andrew., Saito, Atsushi., Loeffler, Tina., Schilcher, Irene., Moaddel, Ruin., Khadeer, Mohammed., Lovett, Jacqueline., Tanaka, Toshiko., Pletnikova, Olga., Troncoso, Juan C., Bennett, David A., Albert, Marilyn S., Yu, Kaiwen., Niu, Mingming., Haroutunian, Vahram., Zhang, Bin., Peng, Junmin., Croteau, Deborah L., Resnick, Susan M., Gorospe, Myriam., Bohr, Vilhelm A., Ferrucci, Luigi and

Thambisetty, Madhav. **A brain proteomic signature of incipient Alzheimer's disease in young APOE 4 carriers identifies novel drug targets.** Science Advanced, 2021. Acesso em: 06/11/2024.

Cehlar O, Skrabana R, Revajova V, Novak M. **Structural aspects of Alzheimer's disease immunotherapy targeted against amyloid-beta peptide.** Indexed and abstracted in Science Citation Index Expanded and in Journal Citation Reports /Science Edition Bratisl Med J 2018; 119 (4):201-4. Acesso em: 06/11/2024.

Ding Y† , Zhao J† , Zhang X, et al. **Amyloid Beta Oligomers Target to Extracellular and Intracellular Neuronal Synaptic Proteins in Alzheimer's Disease.** Front. Neurol., 01 November 2019. Acesso em: 06/11/2024.

Kozin SA, Barykin EP, Mitkevich VA, Makarov AA. **Antiamyloid Therapy of Alzheimer's Disease: Current State and Prospects.** Biokhimiya, 2018; 83 (9): 1331-42. Acesso em: 06/11/2024.

van Dyck CH. **Anti-Amyloid- $\beta$  Monoclonal Antibodies for Alzheimer's Disease: Pitfalls and Promise.** Biol Psychiatry. 2018; 83(4):311–319. Acesso em: 06/11/2024.

Valadares, M. C.; de Oliveira Junior, L. M.; De Carvalho, F. S.; Andrade, L. V. S.; Dos Santos, A. P.; De Oliveira, V.; De Souza Gil, E.; Kato, M. J. **Chemoprotective Effect of the Tetrahydrofuran Lignan Grandisin in the In-Vivo Rodent Micronucleus Assay.** J. Pharm. Pharmacol. 2011, 63 (3), 447–451. Acesso em: 06/11/2024.

Zhai, H.; Inoue, T.; Moriyama, M.; Esumi, T.; Mitsumoto, Y.; Fukuyama, Y. **Neuroprotective Effects of 2,5-Diaryl-3,4-Dimethyltetrahydrofuran Neolignans.** Biol. Pharm. Bull. 2005, 28 (2), 289–293. Acesso em: 06/11/2024.

José Maurício Dos Santos Filho. **Planejamento bioisostérico, síntese e avaliação farmacológica de novos análogos 1,2,4-oxadiazólicos.** UFPE, Recife, 2002. Acesso em: 16/11/2024

Selkoe, D. J. **Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy.** *Physiological Reviews*, v. 81, n. 2, 2001. Acesso em: 18/11/2024

Mietelska-Porowska A, Wojda U. **T Lymphocytes and Inflammatory Mediators in the Interplay between Brain and Blood in Alzheimer's Disease: Potential Pools of New Biomarkers.** *J. immunology res. (Online)* 2017: 1-17, 2017. Acesso em: 19/11/2024

Ren, S.; Breuillaud, L.; Yao, W.; Yin, T.; Norris, K.A.; Zehntner, S.P.; D'Adamio, L. **TNF-alpha-mediated reduction in inhibitory neurotransmission precedes sporadic Alzheimer's disease pathology in young Trem2(R47H) rats.** *J. Biol. Chem.* 2021, 296, 100089. Acesso em: 19/11/2024

Jones, S.A.; Jenkins, B.J. **Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer.** *Nat. Rev. Immunol.* 2018, 18, 773–789. Acesso em: 19/11/2024

Lyra, E.S.N.M.; Gonçalves, R.A.; Pascoal, T.A.; Lima-Filho, R.A.S.; Resende, E.P.F.; Vieira, E.L.M.; Teixeira, A.L.; de Souza, L.C.; Peny, J.A.; Fortuna, J.T.S.; et al. **Pro-inflammatory interleukin-6 signaling links cognitive impairments and peripheral metabolic alterations in Alzheimer's disease.** *Transl. Psychiatry* 2021, 11, 251. Acesso em: 19/11/2024

Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T. *et al.* **The antibody aducanumab reduces A $\beta$  plaques in Alzheimer's disease.** *Nature* 537, 50–56 (2016). <https://doi.org/10.1038/nature19323> Acesso em: 21/11/2024

Xiong, J. et al. **FSH blockade improves cognition in mice with Alzheimer's disease.** *Nature* 603, 470–476 (2022). Acesso em: 21/11/2024

Bird, R.P.; Draper, H.H. **"Comparative Studies on Different Methods of Malonaldehyde Determination."** *Methods Enzymol.* 105, 299-305, 1984.

## Neuroprotective Profile of Triazole Grandisin Analogue against Amyloid-Beta Oligomer-Induced Cognitive Impairment

Victor H. B. de Andrade, Erick Y. M. Rodrigues, Nayara A. F. Dias, Gabriela F. C. Ferreira, Diego B. de Carvalho, Amarith R. das Neves, Paola M. V. Coronel, Murilo K. A. Yonekawa, Eduardo B. Parisotto, Edson A. dos Santos, Albert S. Souza, Edgar J. Paredes-Gamero, Kamylla S. de Sousa, Letícia L. de Souza, Leonardo B. M. Resstel, Adriano C. M. Baroni,\* and Davi C. Lagatta\*

Cite This: *ACS Chem. Neurosci.* 2023, 14, 4298–4310

Read Online

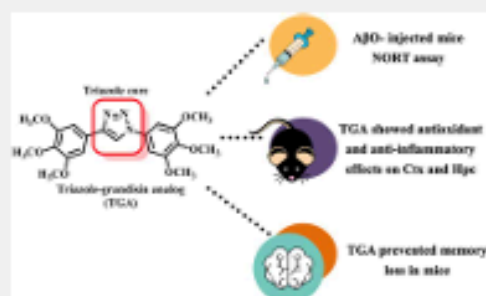
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

**ABSTRACT:** Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder caused by accumulation of amyloid- $\beta$  oligomers ( $A\beta O$ ) in the brain, neuroinflammation, oxidative stress, and cognitive decline. Grandisin, a tetrahydrofuran neolignan, exhibits relevant anti-inflammatory and antioxidant properties. Interestingly, grandisin-based compounds were shown to prevent  $A\beta O$ -induced neuronal death in vitro. However, no study has assessed the effect of these compounds on the AD animal model. This study focuses on a triazole grandisin analogue (TGA) synthesized using simplification and bioisosteric drug design, which resulted in improved potency and solubility compared with the parent compound. This study aimed to investigate the possible in vivo effects of TGA against  $A\beta O$ -induced AD. Male C57/Bl6 mice underwent stereotaxic intracerebroventricular  $A\beta O$  (90  $\mu M$ ) or vehicle injections. 24 h after surgery, animals received intraperitoneal treatment with TGA (1 mg/kg) or vehicle, administered on a 14 day schedule. One day after treatment completion, a novel object recognition task (NORT) was performed. Memantine (10 mg/kg) was administered as a positive control. NORT retention sessions were performed on days 8 and 16 after  $A\beta O$  injection. Immediately after retention sessions, animals were euthanized for cortex and hippocampus collection. Specimens were subjected to oxidative stress and cytokine analyses. TGA reduced the level of cortex/hippocampus lipoperoxidation and prevented cognitive impairment in  $A\beta O$ -injected mice. Additionally, TGA reduced tumor necrosis factor (TNF) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) levels in the hippocampus. By contrast, memantine failed to prevent cortex/hippocampus lipid peroxidation, recognition memory decline, and  $A\beta O$ -induced increases in TNF and IFN- $\gamma$  levels in the hippocampus. Thus, memantine was unable to avoid the  $A\beta O$ -induced persistent cognitive impairment. The results showed that TGA may prevent memory impairment by exerting antioxidant and anti-inflammatory effects in  $A\beta O$ -injected mice. Moreover, TGA exhibited a persistent neuroprotective effect compared to memantine, reflecting an innovative profile of this promising agent against neurodegenerative diseases, such as AD.

**KEYWORDS:** Alzheimer's disease, tetrahydrofuran neolignan derivative, neuroprotection, oxidative stress



### BACKGROUND

As a leading health concern, dementia affects more than 55 million people and is the seventh leading cause of death worldwide, approximately 10 million cases are notified per year.<sup>1</sup> These reports are alarming mainly because the older population has increased over time.<sup>2</sup> The disease impacts different aspects of life in patients and their families, having physical, psychological, social, and economic effects. In 2019, the global cost of dementia was estimated to be US\$1.3 trillion.<sup>1,3</sup>

Dementia is a generic term for several diseases affecting memory and thinking abilities, including Alzheimer's disease (AD). AD is the most common form of dementia, representing

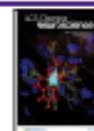
approximately 70% of dementia diagnoses. Despite extensive research in this area, about 150 million people are expected to be living with AD by 2050.<sup>4</sup> As a chronic neurodegenerative disease, AD affects cognitive functions, such as speaking, learning, and memory formation, causing autonomic alterations

Received: June 27, 2023

Revised: November 6, 2023

Accepted: November 20, 2023

Published: December 4, 2023



ACS Publications

© 2023 American Chemical Society

4298

<https://doi.org/10.1021/acschemneuro.3c05943>  
*ACS Chem. Neurosci.* 2023, 14, 4298–4310