



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

---



**ERICK YUDI MARUYAMA RODRIGUES**

**O ANÁLOGO TRIAZÓLICO DA GRANDISINA PREVINE O PREJUÍZO DE  
MEMÓRIA ATRAVÉS DE EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E  
ANTIOXIDANTES EM UM MODELO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

---

**ERICK YUDI MARUYAMA RODRIGUES**

**O ANÁLOGO TRIAZÓLICO DA GRANDISINA PREVINE O PREJUÍZO DE  
MEMÓRIA ATRAVÉS DE EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E  
ANTIOXIDANTES EM UM MODELO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

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

**Co-orientador:** Prof. Dr. Adriano César de Moraes Baroni

## **APRESENTAÇÃO**

Conforme o regulamento estipulado pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, esta dissertação é composta com o resumo deste trabalho, uma revisão de literatura sobre o tema e o artigo científico a ser submetido ao periódico *British Journal of Pharmacology* (ISSN 1476-5381; Fator de Impacto – 9.473; Classificação Qualis 2017-2020 A1).

## RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa crônica causada por acúmulo da proteína beta amiloide ( $A\beta$ ) em regiões específicas do cérebro, tais como o córtex e o hipocampo, levando ao prejuízo de memória devido à inflamação e dano oxidativo. Atualmente existem poucas alternativas farmacológicas para o tratamento da DA, que apresentam efeitos adversos significativos e com eficácia limitada. A grandisina é uma neolignana que possui propriedades anti-inflamatória e antioxidante além de induzir efeitos neuroprotetores frente à aplicação de  $A\beta$  em cultura de células hipocampais. Seu análogo triazólico (AGT) é ainda mais potente. Assim, este estudo objetivou avaliar os efeitos do AGT sobre a formação de memória e estresse oxidativo em um modelo da DA. Camundongos machos C57/Bl6 foram submetidos à estereotaxia para a injeção de  $A\beta$  ou veículo por via intracerebroventricular (ICV). Vinte e quatro horas depois iniciou-se o tratamento por via intraperitoneal (IP) com AGT (1 mg/kg) ou veículo, que se repetiu por 14 dias. Um dia após o final do tratamento, o teste de reconhecimento de objeto (TRO) foi realizado para verificação da formação de memória. Após o final do teste, os animais foram eutanasiados para a coleta do córtex e hipocampo para análise de marcadores de estresse oxidativo e inflamação. Em um outro protocolo, a memantina (10 mg/kg) foi administrada como um controle positivo por 14 dias após a injeção de  $\beta A$ . Neste caso, o TRO foi realizado 7 e 14 dias após o início do tratamento para avaliação do dano cognitivo transitório e persistente, respectivamente. O AGT preveniu o déficit cognitivo induzido pela  $A\beta$ . Adicionalmente, o AGT impediu o aumento da lipoperoxidação cortical e hipocampal. Além do perfil oxidante, a droga teste preveniu o aumento da produção de TNF e INF no hipocampo dos animais que receberam  $\beta A$  após 14 dias de tratamento. O composto foi capaz de induzir efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes persistentes, quando comparados à memantina, uma droga utilizada na clínica para tratamento da doença, refletindo uma prevenção do déficit cognitivo dos animais, mesmo após a interrupção do tratamento. Assim conclui-se que o AGT restaurou a memória de reconhecimento dos animais que receberam injeção de  $\beta A$  através de efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. Tais efeitos foram persistentes quando comparados ao tratamento com memantina, refletindo propriedades inovadoras do composto teste.

**Palavras-chave:** Doença de Alzheimer, neolignanas, neuroproteção, estresse oxidativo

## LISTA DE ABREVIATURAS

**DA** - Doença de Alzheimer  
**AD** - do inglês *Alzheimer's Disease*  
**ADI** - *Alzheimer's Disease International*  
**βA** - proteína beta-amilóide  
**AβO** - oligômero de proteína beta-amilóide  
**GRA** - Grandisina  
**AGT** - Análogo Triazólico da Grandisina  
**TGA** - do inglês *triazole grandisin analogue*  
**NMDA** - N-metil-D-aspartato  
**NINCDS-ADRDA** - *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*  
**APOEε4** - apolipoproteína E4  
**RNA** - ácido ribonucleico  
**APP** - do inglês *amyloid precursor protein*  
**sAPP** - do inglês *soluble amyloid precursor protein*  
**BACE1** - do inglês *β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1*  
**CTF** - do inglês *C-terminal fragment*  
**TNF** - do inglês *tumor necrosis factor*  
**BDNF** - do inglês *brain derived neurotrophic factor*  
**IFN** - interferon  
**IL-6** - interleucina tipo 6  
**IL-12** - interleucina tipo 12  
**MPO** - mieloperoxidase  
**i.c.v.** - intracerebroventricular  
**i.p.** - intraperitoneal  
**MEM** - memantina  
**SEM** - do inglês *Standard Error of the Mean*  
**ELISA** - do inglês *Enzyme-linked immunosorbant assay*  
**TBARS** - do inglês *thiobarbituric acid reactive species*  
**Hpc** - hipocampo  
**Ctx** - cortex  
**NORT** - do inglês *Novel Object Recognition Task*  
**NF-κB** - do inglês *nuclear factor kappa B*  
**CNPq** - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| APRESENTAÇÃO.....  | 3  |
| RESUMO .....   | 4  |
| LISTA DE ABREVIATURAS.....   | 5  |
| SUMÁRIO.....   | 6  |
| LISTA DE FIGURAS .....   | 8  |
| LISTA DE TABELAS .....   | 9  |
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 10 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....   | 11 |
| 2.1 Descoberta da Doença de Alzheimer.....   | 11 |
| 2.2 Epidemiologia da Doença de Alzheimer.....  | 13 |
| 2.3. Proteína beta-amiloide: produção e mecanismos envolvidos na hipersecreção .....   | 17 |
| 2.4. Neurobiologia da Doença de Alzheimer .....  | 19 |
| 2.5. Tratamentos farmacológicos clinicamente disponíveis .....   | 24 |
| 2.6. Potencial de novas drogas anti-inflamatórias e antioxidantes para tratamento .....  | 26 |
| 2.7. Bioisosterismo como estratégia para produção de novas drogas.....   | 28 |
| 3. JUSTIFICATIVA .....   | 30 |
| 4. OBJETIVOS.....  | 31 |
| 4.1 Objetivo Geral .....   | 31 |
| 4.2 Objetivos Específicos .....  | 31 |
| 5. REFERÊNCIAS .....   | 32 |
| 6. TRIAZOLE GRANDISIN ANALOG PREVENTS MEMORY DEFICIT BY ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS IN AN ALZHEIMER'S DISEASE MODEL..... | 1  |
| Abstract .....   | 2  |
| 6.1 Introduction .....   | 3  |
| 6.2 Bullet point summary: .....  | 5  |
| 6.3 Material and methods .....   | 5  |
| 6.3.1. Animals .....   | 5  |
| 6.3.2. Drugs and reagents .....  | 6  |
| 6.3.3. A $\beta$ oligomer (A $\beta$ O) preparation .....  | 6  |
| 6.3.4. Intracerebroventricular injection .....   | 6  |
| 6.3.5. Pharmacological treatment .....   | 7  |
| 6.3.6. Novel object recognition test.....  | 7  |
| 6.3.7. Oxidative stress assays .....   | 8  |
| 6.3.7.1. Lipoperoxidation evaluation.....  | 8  |
| 6.3.7.2. Myeloperoxidase assay .....   | 9  |
| 6.3.7.3. Carbonyl protein assay .....  | 9  |
| 6.3.8. Cytokine Quantification .....   | 9  |

|   |    |
|---|----|
| 6.3.9. Experimental Protocol .....  | 10 |
| 6.3.10. Statistical analysis .....  | 10 |
| 6.4. Results .....  | 11 |
| 6.4.1. Effects of repeated treatment with TGA on cognitive performance in A $\beta$ O injected mice on NORT .....   | 11 |
| 6.4.2. Effects of repeated treatment with TGA on myeloperoxidase activity, lipoperoxidation and protein carbonylation in cortex and hippocampus of A $\beta$ O injected mice..... | 12 |
| 6.4.3. Effects of TGA or MEM on cognitive performance in A $\beta$ O injected mice on NORT after 7 and 14 days of repeated treatment .....  | 15 |
| 6.4.4. Effects of repeated treatment with TGA or MEM on lipoperoxidation in cortex and hippocampus of A $\beta$ O injected mice.....  | 16 |
| 6.4.5. Effects of repeated treatment with TGA or MEM on cytokines levels in hippocampus of A $\beta$ O injected mice .....  | 17 |
| 6.5. Discussion .....   | 19 |
| 6.6. Declarations.....  | 21 |
| 6.6.1. Conflict of interests .....  | 21 |
| 6.6.2. Financial support .....  | 21 |
| 6.7. References .....   | 22 |

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Representação da rota amiloidogênica e não amiloidogênica da APP (proteína precursora amiloide).....                               | 18 |
| Figura 2. Representação das vias do estresse oxidativo e alterações fisiológicas relacionadas à deposição de proteína $\beta$ -amiloide..... | 23 |
| Figura 3. Representação da molécula da grandisina e a modificação molecular realizada, levando a grandisina triazol.....                     | 29 |

### ARTIGO CIENTÍFICO

|   |    |
|---|----|
| Figure 1. Chemical structure of the tetrahydrofuran lignan grandisin and its bioisoster, triazole analogue grandisin (TGA). .....   | 5  |
| Figure 2. (a) Simplified experimental timeline, (b) Novel Object Recognition Task. ....   | 10 |
| Figure 3. (a) Locomotor activity of mice of each experimental group expressed as number of subsection crossings performed in the Open Field Test, (b) Discrimination index (d2) evaluated in the Novel Object Recognition Task..... | 11 |
| Figure 4. Myeloperoxidase in Hpc (a) and Ctx (b) of A $\beta$ O and control mice treated with vehicle of TGA. ....  | 12 |
| Figure 5. Lipid peroxidation (TBARS-nmol/mg) in Hpc (a) and Ctx (b) of A $\beta$ O and control mice treated with vehicle of TGA. ....   | 12 |
| Figure 6. Protein carbonyls levels (mmol/mL) in Hpc (a) and Ctx (b) of A $\beta$ O and control mice treated with vehicle of TGA. ....   | 13 |
| Figure 7. Discrimination index (d2) evaluated in the Novel Object Recognition Task. (a)After 7 days of treatment, (b)After 14 days of treatment. ....   | 15 |
| Figure 8. Lipid peroxidation (TBARS-nmol/mg) in hippocampus (a) and cortex (b) of A $\beta$ O and control mice treated with vehicle, MEM or TGA. ....   | 16 |
| Figure 9. Pro-inflammatory cytokines concentrations in Hpc of mice.....   | 17 |



## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO CIENTÍFICO

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1. Pro-oxidant enzymatic activity and neuronal oxidative damage markers in hippocampus and cortex among experimental groups. .... | 13 |
|--|----|

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é um transtorno neurodegenerativo de caráter crônico e progressivo, que prejudica processos cognitivos e formação de memória, como também deficiência motora e alterações autonômicas. Vários fatores demográficos como, idade, sexo, etnia e classe social são fatores de risco para o desenvolvimento da DA, sendo a idade o mais importante deles. Estima-se uma prevalência de 19% entre indivíduos de 75 – 84 anos de idade (A. ARMSTRONG, 2019). Além disso, o Alzheimer's Disease International (ADI) relatou por meio do “World Alzheimer Report 2018” uma prevalência de 50 milhões de pessoas com demência em todo o mundo, sendo que a projeção é que esse número triplique até 2050.

A presença de placas amilóides e emaranhados neurofibrilares em áreas encefálicas são os principais achados histopatológicos da DA. O acúmulo e deposição da proteína  $\beta$ A e hiperfosforilação da proteína Tau resultam em alterações bioquímicas, neuroinflamação e estresse oxidativo, o que culmina em danos ao córtex e hipocampo, que são estruturas relacionadas à função cognitiva e processos de formação de memória (SCHELTENS et al., 2021).

As estratégias terapêuticas utilizadas no tratamento da DA visam diminuir a intensidade dos sintomas e progressão da doença. Essas opções terapêuticas têm efeito nos casos leves a moderados da doença, porém são ineficazes nos casos mais avançados. Além disso, a terapia atual não consegue impedir o avanço da deterioração cognitiva da DA e apresentam efeitos colaterais importantes (CUMMINGS; TONG; BALLARD, 2019).

Sendo assim, é importante o desenvolvimento de novas opções farmacológicas que se mostrem mais eficazes para o tratamento da DA. Dessa forma, produtos de origem natural podem se apresentar como uma fonte de novos fármacos, dado a variedade de compostos encontrados em plantas que apresentam propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (NANI et al., 2021).

Nesse contexto, a grandisina (GRA), uma neolignana que pode ser encontrada na planta *Virola surinamensis*, apresentou atividade anti-inflamatória, sendo capaz de diminuir a formação de edemas e também reduzir o tempo de reação à dor em camundongos (CARVALHO et al., 2010). Outro estudo realizado pelo Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular da Universidade de São Paulo (USP) aponta a capacidade de um metabólito da grandisina em sequestrar radicais livres, apresentando, portanto, atividade antioxidante (VALADARES et al., 2011).

Recentemente, no laboratório de química farmacêutica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) foi sintetizado um análogo triazólico da grandisina (AGT). Dados não publicados sugerem que este composto é ainda mais potente quando comparado à grandisina em experimentos realizados *in vitro*. Além disso, neolignanas tetraidrofurânicas apresentaram efeitos

neuroprotetores em cultura de células hipocampais tratadas com  $\beta$ -amiloide (ZHAI et al., 2005). Entretanto, moléculas deste grupo químico nunca foram testadas em modelos in vivo da DA. Dessa forma, o presente trabalho avaliou os possíveis efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do AGT, assim como, sua capacidade de prevenir o prejuízo cognitivo em camundongos submetidos ao modelo da Doença de Alzheimer.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Descoberta da Doença de Alzheimer**

Em 1907, Alois Alzheimer, um psiquiatra alemão, publicou em um artigo sobre uma paciente chamada Auguste Deter, que desde 1901 demonstrava sintomas psiquiátricos com rápida progressão, tais como problemas de sono, memória e estado emocional inconstante. No hospital psiquiátrico, Auguste D. não conseguia reconhecer objetos previamente apresentados, bem como ler corretamente, e pouco mais de quatro anos depois, veio a óbito (HIPPIUS; NEUNDÖRFER, 2003; STELZMANN; NORMAN SCHNITZLEIN; REED MURTAGH, 1995).

Alzheimer, então, obteve material da paciente para análise, pois os sintomas clínicos já eram divergentes de outros processos patológicos conhecidos. Foi observado que o cérebro apresentava acentuada atrofia sem um foco de degeneração macroscópico, aterosclerose nos vasos maiores, juntamente com fibras gliais sem infiltração de vasos. Através de uma técnica recente de impregnação por prata, foram descobertas fibrilas cuja coloração era diferente de outras neurofibrilas, denotando provável mudança de composição. Estas estavam presentes em todo córtex, mais numerosas nas camadas mais externas (STELZMANN; NORMAN SCHNITZLEIN; REED MURTAGH, 1995).

Seu tutor, Emil Kraepelin, a fim de homenageá-lo por sua descoberta bastante significativa, foi o primeiro a propor o termo “Doença de Alzheimer” na 8ª edição de seu livro *Psychiatrie - Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte* (1910) (GOEDERT; GHETTI, 2007; HIPPIUS; NEUNDÖRFER, 2003). Alzheimer publicou, em 1911, o caso de Johann F., que foi o segundo caso diagnosticado com a Doença de Alzheimer, porém sem as placas neurofibrilares (ALZHEIMER, 1911). Contudo até então não havia um grande foco na pesquisa desta condição médica.

Em Londres, pouco mais de 50 anos após estes achados, Michael Kidd e colaboradores reportaram a observação de filamentos emaranhados neurofibrilares no córtex de pacientes diagnosticados com Doença de Alzheimer, suspeitando serem compostos de substância amilóide (KIDD, 1963). No mesmo ano, porém em Nova Iorque – Estados Unidos, Robert D. Terry e colaboradores também relataram a presença destas neurofibrilas no córtex de diferentes pacientes,

estabelecendo agora uma correlação entre a presença de substância amiloide e os emaranhados neurofibrilares, por microscopia eletrônica (TERRY, 1963).

A pesquisa para a Doença de Alzheimer foi alavancada principalmente após a divulgação do estudo de Robert Katzman, onde ele menciona que as formas “senis” e “pré-senis” da patologia são muito semelhantes, e também anunciando a sua alta prevalência entre indivíduos acima de 65 anos no norte da Europa – denotando também o subdiagnóstico da Doença de Alzheimer nos Estados Unidos (KATZMAN, 1976).

Neste mesmo ano, o grupo de pesquisa de Bowen descreve indícios de que a demência senil, responsável por grande porcentagem dos casos de demência acima de 60 anos está relacionada à falta de síntese do neurotransmissor acetilcolina no córtex pré-frontal (BOWEN et al., 1976), sendo proposta no periódico *The Lancet*, em dezembro de 1976, a hipótese de que a baixa concentração de acetilcolina esteja ligada ao processo patológico da Doença de Alzheimer (nomeada desde então como a hipótese colinérgica) (DAVIES; MALONEY, 1976), sendo utilizada para o desenvolvimento dos primeiros fármacos contra a Doença de Alzheimer, como a tacrina e o donepezil (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1997, 1997).

De 1988 a 1989 foram achados vestígios do componente imunológico e inflamatório envolvido no dano cerebral causado pela Doença de Alzheimer. Sugeriu-se que acúmulo da proteína beta-amilóide no sistema nervoso central, semelhante aos sinais periféricos, causa ativação de células fagocíticas ao redor de placas amilóides, levando a cadeia inflamatória e destruição celular ao serem apresentadas como antígenos para células imunes (ROGERS et al., 1988). Esta alta deposição de placas ocorre também na massa cinzenta (área com maior número de corpos celulares e células da glia), indicando também que a cadeia inflamatória vem posteriormente a fagocitose da proteína beta-amilóide (ITAGAKI et al., 1989). Através destas descobertas houve um maior foco no estudo do componente inflamatório para o tratamento da Doença de Alzheimer (MCGEER; ROGERS, 1992) (ROGERS et al., 1993).

Outra hipótese, utilizada até agora no tratamento paliativo da Doença de Alzheimer, é a proposta da excitotoxicidade glutamatérgica. Foi postulado o efeito tóxico do glutamato através do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), com redução de receptores NMDA no córtex e hipocampo de cérebros humanos com demência por Doença de Alzheimer. Toxicidade por glutamato reproduz as mudanças bioquímicas e anatômicas presentes na Doença de Alzheimer e também estimula *in vitro* filamentos helicoidais conhecidos hoje como os emaranhados neurofibrilares (DE BONI; MCLACHLAN, 1985; GREENAMYRE et al., 1988). O medicamento utilizado com base nesta proposta é a memantina, aprovada nos Estados Unidos para o tratamento da Doença de Alzheimer

moderada a avançada (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2003).

## 2.2 Epidemiologia da Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa de caráter crônico, sendo a causa de demência mais notificada. De fato, estima-se que ela seja responsável por 60% dos casos de demência, sendo o tipo mais comum até este momento. A demência vascular é a segunda causa mais comum, com 20% das ocorrências (RIZZI; ROSSET; RORIZ-CRUZ, 2014).

O critério para diagnóstico específico para a demência por Doença de Alzheimer baseia-se no *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (atualmente na 5ª edição), contudo era-se utilizado o critério NINCDS-ADRDA de 1984, que possui sensibilidade e especificidades insatisfatórias em comparação ao novo critério. Neste critério ainda havia a limitação de não empregar biomarcadores originalmente, não se considerar a existência pré-clínica da doença e da técnica ser utilizada para exclusão dos demais tipos, e não da confirmação da Doença de Alzheimer (REIMAN et al., 2011), implicando que há subdiagnóstico no número de casos detectados e relatados pelos profissionais (“2022 Alzheimer’s disease facts and figures”, 2022).

Os fatores de risco para o desenvolvimento de demência são diversos. Como exemplos há doenças cardiovasculares (hipertensão arterial, arritmias, níveis elevados de colesterol dentre outras), diabetes mellitus tipo II, epilepsia e depressão, estilos de vida como sedentarismo, distúrbios do sono, etilismo, tabagismo e dieta com elevado teor de lipídios também podem levar ao aumento da incidência da Doença de Alzheimer (EDWARDS III et al., 2019).

Ainda dentre os fatores de risco existe o fator genético da Doença de Alzheimer. Tradicionalmente realça-se a importância do gene APOE $\epsilon$ 4, o mais fortemente associado a casos de demência de início tardio (CORDER et al., 1993; STRITTMATTER et al., 1993). Contudo há relato de que 29 *loci* genéticos associados a 215 genes potenciais foram identificados, relacionados a resposta imune e metabolismo de lipídeos em grande parte (JANSEN et al., 2019).

Em 2019, estima-se que o número de casos de demência no mundo seja, em média, 57.4 milhões, com projeção de que em 2050 este número eleve-se para 152.8 milhões, e a prevalência da doença é maior em mulheres do que em homens (1.69 vezes mais casos) (NICHOLS et al., 2022). Há uma provável relação de aumento de mortalidade e risco de desenvolver demência com o menor nível de escolaridade dos idosos, não se encaixando neste estudo idosas com maior nível de escolaridade, que demonstraram maior prevalência de demência (CRIMMINS et al., 2018).

Devido ao dimorfismo sexual presente na espécie humana, o metabolismo entre homens e mulheres é bastante diferente, levando grupos a investigarem a explicação para a prevalência superior em mulheres. Sugere-se que o gene APOE $\epsilon$ 4 confere a mulheres um risco maior de desenvolvimento da

Doença de Alzheimer, possivelmente por interferência na patologia pela proteína Tau (ALTMANN et al., 2014). Também, levanta-se a hipótese de certos tipos de RNA associados a doenças neurodegenerativas podem aumentar o risco do desenvolvimento destas doenças em mulheres (CAO et al., 2019).

Os estudos epidemiológicos a cerca desta doença neurodegenerativa são contrastantes entre os países de alta renda e os países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Enquanto em países de alta renda a prevalência de demências não possui altas variações, existem vários estudos relatando estabilidade em sua ocorrência, correspondendo até 42% dos casos globais estimados de 2010 até 2050. Países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, contudo, possuem prevalências altamente variáveis, com número reduzido de estudos porém demonstrando tendência de alta, podendo chegar até a 70.5% dos casos da doença no mundo até 2050 (ALLADI; HACHINSKI, 2018).

Ainda relacionando a questões regionais, embora haja a tendência de aumento na incidência global, espera-se que países asiáticos da região do Oceano Pacífico com alto aporte financeiro e da Europa Ocidental possuam acréscimo menos acentuado (aumento em média de 53% e 74% respectivamente). Contudo países do Oriente Médio, da porção norte da África e a África subsaariana sofrerão maior impacto (aumento de 357% para a porção subsaariana e 367% para as demais). Presumidamente o aumento geral da prevalência deve-se ao aumento populacional e do seu envelhecimento, embora em proporções diferentes a cada região (NICHOLS et al., 2022).

Nos Estados Unidos calcula-se que em média 11,3% dos habitantes americanos acima de 65 anos possuam demência causada por Doença de Alzheimer. Com a idade há o aumento desta taxa, sendo de 5.3% para idosos entre 65 e 64 anos, 13.8% para aqueles de 75 a 84 anos, sendo em média 34.6% acima de 85 anos. Etnicamente, 18.6% dos indivíduos de etnia afro-americana e 14% dos hispânicos acima de 65 anos possuem a Doença de Alzheimer, em comparação a 10% dos caucasianos (“2022 Alzheimer’s disease facts and figures”, 2022; RAJAN et al., 2021).

A incidência da Doença de Alzheimer de 65 a 74 anos é de aproximadamente 0.4%, aumentando para 3.2% de 75 a 84 anos, se aproximando de 7.6% acima dos 85 anos (RAJAN et al., 2019). Em um estudo feito em uma população de Framingham (estado de Massachusetts/EUA), observou-se que este risco é de cerca de 11.6% para homens e 21.1% para mulheres (“2022 Alzheimer’s disease facts and figures”, 2022; SATIZABAL et al., 2016). Também já foi estipulado o risco de “viés do sobrevivente”, onde os números de demência em pesquisas podem ser divergentes por certos fatores, tais como a maior expectativa de mulheres com a patologia ou o menor risco cardiovascular destas (BOTS; PETERS; WOODWARD, 2017; MIKKOLA et al., 2013; SHAW et al., 2021), sendo um enfoque interessante para demais estudos.

Nos Estados Unidos existem os planos de saúde governamentais *Medicare* e *Medicaid*, sendo que o primeiro é federal e abrange idosos acima de 65 anos com alguns tipos de condições e deficiências, enquanto o segundo é uma união federal-estadual para a população menos favorecida (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES, 2022). Aproximadamente 321 bilhões de dólares americanos são gastos para os cuidados em demências: \$146 bilhões são gastos pelo *Medicaid* (45% do total), \$60 bilhões pelo *Medicare* (19% do total), \$81 bilhões de forma privada (25% do total) e \$34 bilhões de outras fontes (“2022 Alzheimer’s disease facts and figures”, 2022).

De acordo com o Departamento de Saúde e Serviços Humanos (EUA), 38.6 pessoas a cada 100.000 morreram por Doença de Alzheimer de forma não específica, em comparação a 27.0 pessoas em 2010, e 17.6 em 2000 – a Doença de Alzheimer de início precoce equivale a 0.2 morte/100.000 habitantes, e a de início tardio (acima de 65 anos) equivale a 0.9 morte/100.000 habitantes (“CDC WONDER - Underlying Cause of Death, 1999-2020”, 2020), servindo de evidência da progressão da Doença de Alzheimer como causa de morte. Mesmo após ajuste por idade das taxas de morte, ainda há um aumento de 54.5% entre o período de 1999-2014 (TAYLOR et al., 2017).

Rudolph e colaboradores descrevem que em um acompanhamento de em média 3.0 anos, 66% dos idosos com possível diagnóstico ou com Doença de Alzheimer já confirmada foram hospitalizados ao menos uma vez e 47% duas ou mais vezes, estando internadas cerca de 3 dias por pessoa-ano. À

medida que os fatores de risco aumentavam o risco acumulativo também aumenta – idosos sem fatores de risco possuíam 38% de taxa de hospitalização, chegando a até 85% em caso de quatro ou cinco fatores de risco. Os fatores de risco avaliados são sociodemográficos, variáveis relacionadas a demência e variáveis contínuas (tal como o grau de demência) (RUDOLPH et al., 2010).

Devido ao impacto na capacidade de atuar no cotidiano dos portadores de demências em geral, há a necessidade de auxílio de terceiros em seus cuidados – 11% dos cuidadores citam demências como a maior enfermidade do idoso cuidado, embora 26% admitam que as pessoas que são cuidadas possuem alguma forma de demência (“Caregiving in the U.S. - 2020 Report”, 2020).

Dos dados obtidos da *Global Burden of Disease* (GBD) de 2000 a 2016, em 2016 a prevalência de demência no Brasil é de 1036.9 pessoas a cada 100.000 habitantes (em torno de 1,04%), com aumento de 4.5% da incidência. Ela é tida como a segunda maior causa de morte em pessoas acima de 70 anos em 2016 para ambos os gêneros no país, dada como provável justificativa a progressão da longevidade (MELO et al., 2020).

De 2010 a 2019, os dados de internação do DATASUS demonstraram que houve um aumento expressivo na internação de homens (97.4% contra 83.1% das mulheres), no número de indivíduos pardos hospitalizados (224% contra 73.2% de brancos e 63.3% de negros) e nos idosos acima de 80 anos (aumento de 115.1%) – a região Nordeste e Centro-Oeste tiveram o maior aumento no número de hospitalizações do país (aumentos de 172.1% e 144.2%, respectivamente) (FETER et al., 2021).

Pelas informações obtidas do DATASUS de 2008 a 2020, 18.69% das pessoas internadas por conta especificamente da Doença de Alzheimer vieram a falecer, resultando em 2780 óbitos. A taxa de mortalidade foi maior para a região Sudeste (21.34%) e menor na região Norte (10.35%). Os internados pela patologia ficaram em média 26.0 dias no hospital, resultando por paciente um custo de R\$1921 para a internação e R\$26.13 milhões em custos hospitalares no total. Em números absolutos, são aproximadamente R\$28.21 milhões gastos no total por 22.112 internações (ROCHA DE ALMEIDA; CALMON NOGUEIRA DA GAMA PEREIRA, 2022). Portanto são notáveis os impactos na saúde pública brasileira devido a Doença de Alzheimer, afetando também aspectos econômicos e psicossociais.



### 2.3. Proteína beta-amiloide: produção e mecanismos envolvidos na hipersecreção

A proteína  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) existe sob diversas formas como a  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$ , cujas numerações são referentes a quantidade de aminoácidos de sua composição. Contudo, todas advêm da clivagem da proteína precursora amilóide (APP-*amyloid precursor protein*). Através do gene APP, o precursor da proteína  $\beta$ -amilóide e proteínas semelhantes a APP (APLP1 e APLP2) são sintetizadas em mamíferos, sendo apenas a proteína APP responsável pela produção da proteína  $\beta$ -amilóide (MÜLLER; DELLER; KORTE, 2017).

Dos três isotipos expressos APP695, APP751 e APP770, o RNA mensageiro do primeiro isotipo aparece com o dobro de frequência do APP751, e 20 vezes mais que o APP770 no córtex frontal, onde a concentração de proteína  $\beta$ -amilóide é maior (TANAKA et al., 1989).

A família das APPs possuem o papel fisiológico na formação de memória e no aprendizado, sendo sua ausência responsável por redução de sinapses e plasticidade sináptica hipocampais, prejuízo na memória espacial e causam hiperexcitabilidade neuronal no hipocampo de camundongos com três meses de idade (LEE et al., 2020). Entretanto, camundongos que não expressam produção da proteína APP possuem redução da atividade locomotora como também déficit cognitivo (SENECHAL; KELLY; DEV, 2008). Dito isto, a APP pode ser clivada sob duas rotas: a via amiloidogênica e a não-amiloidogênica.

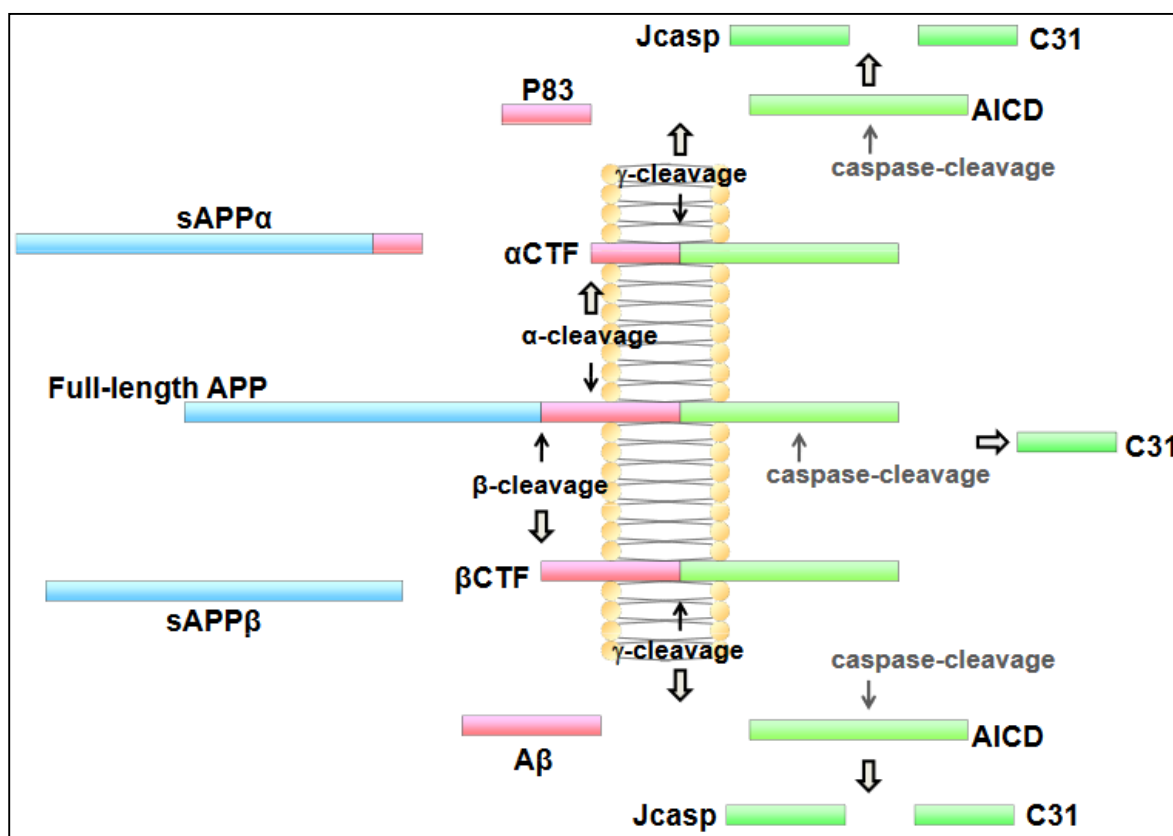
A via não-amiloidogênica inicia-se com a ação da enzima proteolítica  $\alpha$ -secretase, que cliva a APP em dois fragmentos. O primeiro se mantém dentro da célula e o segundo na membrana: sAPP $\alpha$  e  $\alpha$ CTF (respectivamente, proteína precursora amilóide- $\alpha$  solúvel e fragmento  $\alpha$ -C-terminal) (ESCH et al., 1990).

O fragmento sAPP $\alpha$  possui funções biológicas relatadas como a manutenção das estruturas dendríticas com o envelhecimento, inibição da neurotoxicidade da proteína  $\beta$ -amilóide e proteção contra hipoglicemia e excitotoxicidade glutamatérgica (MATTSON et al., 1993; TACKENBERG; NITSCH, 2019; TYAN et al., 2012), enquanto o fragmento restante  $\alpha$ CTF aparenta ter função na inibição da  $\gamma$ -secretase (TIAN; CRUMP; LI, 2010), sendo a  $\alpha$ -secretase estudada então como um potencial alvo terapêutico.

Na via amiloidogênica há primeiramente a atividade de outra classe de secretases, as  $\beta$ -secretases – uma família de enzimas cuja atividade aumenta com a senescência (FUKUMOTO et al., 2004). Elas existem tanto como as BACE1 (enzima de clivagem de APP no sítio  $\beta$  1) e as BACE2, embora as BACE1 sejam as mais predominantes no processo da geração de  $\beta$ -amilóide (AHMED et al., 2010). Neste caso, a APP é clivada e gera então o fragmento  $\beta$ CTF através da ação das  $\beta$ -secretases e o respectivo metabólito citosólico sAPP $\beta$ .

Este metabólito possui 16 aminoácidos a menos que sua contraparte sAPP $\alpha$ , mas ainda possui efeitos fisiológicos como promover o crescimento de axônios, embora com menor eficiência que o fragmento  $\alpha$  (CHASSEIGNEAUX et al., 2011) e ofereça cerca de apenas 1% da eficiência da sAPP $\alpha$  com relação à proteção contra excitotoxicidade glutamatérgica e os danos por  $\beta$ -amilóide (FURUKAWA et al., 1996).

Um terceiro tipo de secretase, a  $\gamma$ -secretase, está envolvido no processo da geração da  $\beta$ -amilóide. Esta enzima, diferente das outras duas secretases, atua no fragmento presente na membrana – não específica aos fragmentos CTF, sendo inespecífico e possuindo vários substratos relacionados (KOPAN; ILAGAN, 2004). A  $\gamma$ -secretase é a responsável por clivar a  $\alpha$ CTF e a  $\beta$ CTF, originando um fragmento P83 e a proteína  $\beta$ -amilóide, respectivamente: os mais estudados são A $\beta_{1-42}$  e A $\beta_{1-40}$ , contudo outros fragmentos podem ser gerados, como a A $\beta_{1-46}$  (ZHAO et al., 2004).



**Figura 1.** Representação da rota amiloidogênica e não amiloidogênica da APP (proteína precursora amilóide). A APP íntegra pode sofrer a clivagem  $\alpha$  ou  $\beta$  – a clivagem  $\alpha$  (cascata não amiloidogênica, representada na parte superior) resulta em moléculas com potencial neuroprotetor ou neurotrófico, enquanto a clivagem  $\beta$  (cascata amiloidogênica, região inferior) resulta em metabólitos tóxicos, como

monômeros de  $\beta$ -amiloide. A cascata amiloidogênica se encontra estimulada em comparação a não amiloidogênica na DA. (ZHANG et al., 2011)

## 2.4. Neurobiologia da Doença de Alzheimer

Como citado anteriormente, a Doença de Alzheimer pode ser confirmada pelo depósito de placas de  $A\beta$  e a presença dos emaranhados neurofibrilares. A proteína  $\beta$ -amilóide é produzida fisiologicamente a nível picomolar, auxiliando a viabilidade neuronal, aumento na atividade hipocampal em processos de memória e aprendizado, como também reciclagem de vesículas sinápticas empregadas para a neurotransmissão (LAZAREVIC et al., 2017; PLANT et al., 2003; PUZZO et al., 2008, 2011; YANKNER; DUFFY; KIRSCHNER, 1990).

Neste contexto, concentração de  $\beta$ -amiloide é mantida a níveis homeostáticos através do *clearance* cerebral, que supera parcialmente sua produção (BATEMAN et al., 2006). A sua eliminação pode ocorrer de algumas maneiras: através de fluído intersticial sob modulação de atividade sináptica; através do metabolismo de certas proteases; via transporte através da barreira hematoencefálica por proteínas como a apolipoproteína E; fagocitose através da micróglia, dentre outras vias (CIRRITO et al., 2005; DEANE et al., 2008; KOENIGSKNECHT; LANDRETH, 2004; LEISSRING et al., 2003; MINERS et al., 2011; PAN et al., 2011; RIES; SASTRE, 2016; SAIDO; LEISSRING, 2012; WILDSMITH et al., 2013).

A formação dos oligômeros de  $\beta$ -amiloide é uma polimerização dependente de nucleação: os monômeros da proteína se mantêm em equilíbrio termodinâmico, não sendo favorável a formação destes núcleos. Contudo, ao se formar um núcleo de vários monômeros de  $A\beta$ , a reação entra no estágio de alongação, onde essas “sementes” dos núcleos já formados, promovendo a formação de protofibrilas, e então as fibrilas maduras (JARRETT; LANSBURY, 1993; ONO; WATANABE-NAKAYAMA, 2021; WALSH et al., 1997, 1997). O peptídeo possui tendências de formar folhetos- $\beta$  ao se oligomerizar, podendo lembrar “grampos de cabelo”, sendo mais presente conforme a polimerização ocorre (KIRSCHNER; ABRAHAM; SELKOE, 1986; ONO; CONDRON; TELOW, 2009; PETKOVA et al., 2002).

Os oligômeros da  $\beta$ -amiloide afetam primariamente as sinapses glutamatérgicas do Sistema Nervoso Central, afetando a cinética de liberação e recaptção de glutamato. Fisiologicamente, a liberação de vesículas de glutamato na fenda sináptica ocorre por exocitose mediada por cálcio. Após a liberação o glutamato atinge a membrana pós-sináptica onde ativa vários tipos de receptores ,

incluindo os receptores ionotrópicos NMDA (N-metil-D-aspartato). A ativação de tais receptores levam a efeitos neuroprotetores favorecendo mecanismos de aprendizado e formação de memória. Uma das bases moleculares para a ocorrência de tais fenômenos seria a liberação de neurotrofinas, tais como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF- *brain derived neurotrophic factor*). Este fator estimula a expressão gênica, aumentando a formação de brotos dentríticos e neurgênese hipocampal (HETMAN; KHAREBAVA, 2006; IKONOMIDOU; STEFOVSKA; TURSKI, 2000; JOURDI et al., 2009; PAPADIA et al., 2008; POHL et al., 1999). O equilíbrio dos níveis sinápticos de glutamato são mantidos pelos astrócitos, que realizam a recaptação de glutamato e o armazenam em vesículas de glutamina pela glutamina sintetase, o precursor de glutamato; a glutamina pode ser levada aos neurônios pré-sinápticos novamente e então ser convertida em glutamato pela glutaminase para reutilização (RUDY et al., 2015).

Devido ao acúmulo de oligômeros de  $\beta$ -amiloide nas sinapses, múltiplos mecanismos de toxicidade ocorrem: há um aumento da secreção de glutamato pelo terminal pré-sináptico por conta da  $\beta$ -amiloide (BRITO-MOREIRA et al., 2011; JANG et al., 2014) e pelos astrócitos (PIRTTIMAKI et al., 2013; TALANTOVA et al., 2013), havendo ainda interferência nas proteínas recaptadoras que internalizam glutamato nos astrócitos, GLAST e GLT-1 (MATOS et al., 2008; SCIMEMI et al., 2013). Com o excesso de glutamato na fenda sináptica, este mediador transborda para o espaço extrasináptico, ativando receptores NMDA extrasinápticos (e-NMDA). Quando ativados estes receptores permitem a entrada de cálcio, que por sua vez estimulam vias neurotóxicas tais como a liberação de caspase, e formação de emaranhados neurofibrilares intracelulares que potencializam a morte neural (HARDINGHAM; FUKUNAGA; BADING, 2002; RUDY et al., 2015; TALANTOVA et al., 2013).

Os emaranhados neurofibrilares são compostos de proteína Tau modificada pós-tradução, sendo hiperfosforiladas. A proteína Tau é composta por até 441 resíduos de aminoácido e possui uma estrutura de baixa complexidade, sendo uma proteína resistente a variações de pH e salinidade (JEGANATHAN et al., 2008; MUKRASCH et al., 2009). Sua atividade biológica baseia-se principalmente na formação de microtúbulos, mantendo a morfologia dos axônios e dendritos (WEINGARTEN et al., 1975). Contudo devido a gama de ligantes com os quais interage, a proteína Tau pode haver papéis biológicos variados, tais como a neurotoxicidade quando hiperfosforilada. Nesta situação, ela está envolvida na desagregação das sinapses que ocorre ao longo da Doença de Alzheimer (MORRIS et al., 2011).

Um outro elemento de enfoque na Doença de Alzheimer é a neuroinflamação junto do estresse oxidativo: ambos os processos são presentes neste processo patológico e contribuem de forma substancial, visto como altos níveis de marcadores oxidativos e de citocinas pró-inflamatórias

(HENSLEY et al., 1995; WANG et al., 2015b).

Uma das citocinas pró-inflamatórias é o fator de necrose tumoral (TNF), que pode ativar vias de necroptose, uma modalidade de morte celular resultante da ativação de receptores RIPK1 e principalmente RIPK3 (acrônimos para quinase proteica com interação a receptor tipo 1 ou 3) (DHURIYA; SHARMA, 2018).

A via necroptótica está altamente estimulada em tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer *post-mortem*, sendo então significativamente revertida por inibidores de RIPK1 e RIPK3, demonstrando a importância do TNF nesta patologia (JAYARAMAN et al., 2021). Em outros estudos, observou-se uma melhoria na capacidade cognitiva de pacientes com Doença de Alzheimer e em modelos animais após administração de inibidores de TNF- $\alpha$  e curcumina, composto natural de capacidade antioxidante e anti-inflamatória (TORRES-ACOSTA et al., 2020).

O interferon (IFN) é descrito por influenciar no metabolismo da APP, especialmente via  $\gamma$ -secretase. Junto do TNF- $\alpha$ , ele promove o aumento da expressão desta secretase, que participa no processo final da formação da  $\beta$ -amiloide (LIAO et al., 2004). Em modelo transgênico murino, as placas amilóides estimularam a secreção do IFN pela micróglia e pelos astrócitos, causando aumento da ação da  $\beta$ -secretase e o declínio de sua eliminação (YAMAMOTO et al., 2007).

As interleucinas tipo 6 e tipo 12 (IL-6 e IL12) são citocinas pró-inflamatórias relevantes para a DA. IL-6 aparece em tecidos *post-mortem* de pacientes com DA em concentrações elevadas em astrócitos próximos de depósitos amiloides. Modelos animais nos quais há expressão acentuada de IL-6 demonstram ter alta ativação de micróglia e estímulo secundário de produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como TNF (GYENGESI et al., 2019; LYRA E SILVA et al., 2021)

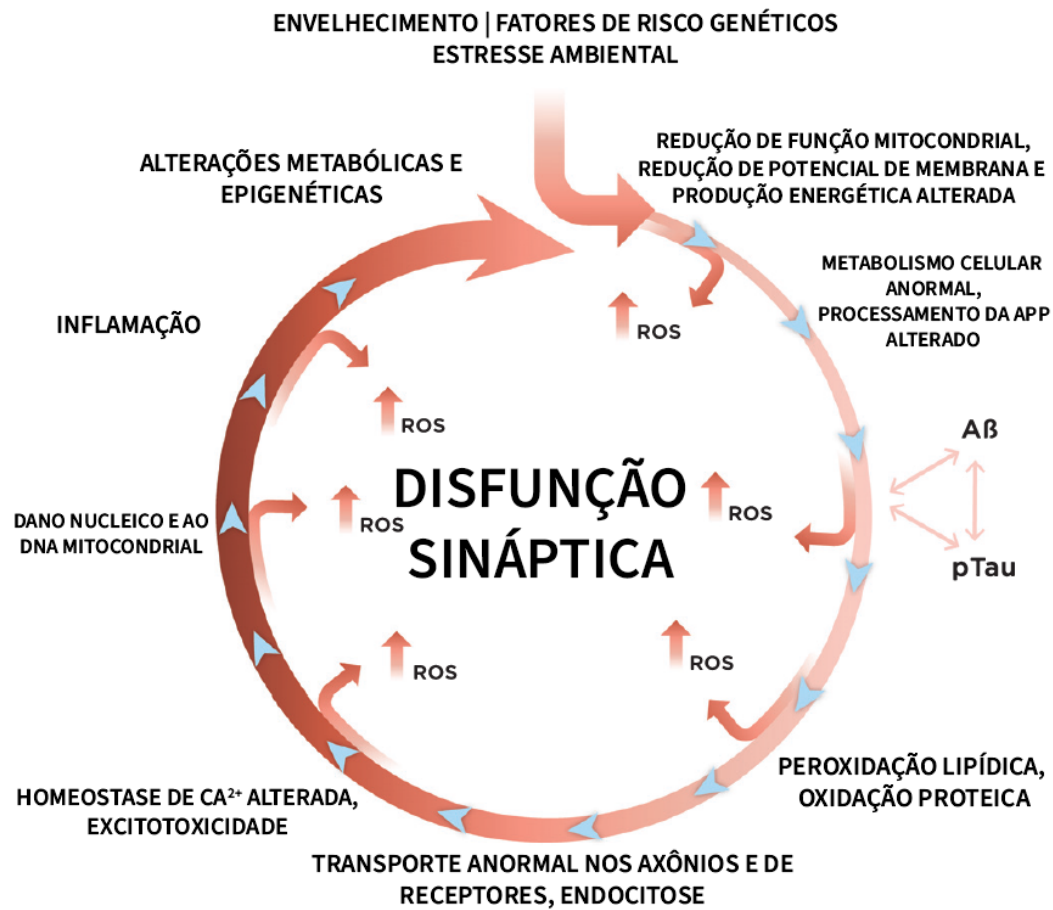
A interleucina 12, junto do TNF- $\alpha$  e IL-6, apresenta estar em maior quantidade no sangue periférico em portadores de Doença de Alzheimer em comparação a indivíduos saudáveis (SWARDFAGER et al., 2010). A inibição da sinalização via IL-12 demonstrou reduzir tanto a concentração de proteína amilóide cerebral quanto o déficit cognitivo em modelo de camundongo transgênico da Doença de Alzheimer (VOM BERG et al., 2012). Em outro modelo transgênico de camundongos, a redução da unidade p40 desta citocina causou redução de placas amilóides em camundongos machos e a redução do oligômero  $\beta A_{1-40}$  em fêmeas (EEDE et al., 2020), denotando a relevância desta citocina no processo neurodegenerativo.

O papel do estresse oxidativo se dá pelo aumento de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio, baixa proteção antioxidante ou metais de transição livres, promovendo uma catalização da formação de radicais livres, especialmente por íons ferrosos (Reação de Fenton), ocorrendo, finalmente, a oxidação de lipídios, proteínas e DNA (FENTON, 1894; HALLIWELL, 2001).

O cérebro é altamente vulnerável ao estresse oxidativo: utiliza aproximadamente 20% do O<sub>2</sub> tendo uma reduzida massa em relação ao corpo, possui altos níveis de ácidos graxos insaturados, abundância de íons ferrosos e o metabolismo de muitos neurotransmissores, tais como dopamina e noradrenalina, forma radicais livres (HALLIWELL, 2001; SVENNERHOLM, 1968).

Ressalta-se também que o cérebro possivelmente não possui um grande aporte de proteção antioxidante, como níveis relativamente baixos de catalase no córtex frontal (BRANNAN; MAKER; RAES, 1981; ZIMATKIN; LINDROS, 1996)) e que células da micróglia produzem citocinas pró-inflamatórias devido ao dano celular, agravando ainda mais o estresse oxidativo por também produzirem espécies radicalares (SIMPSON; OLIVER, 2020).

A mieloperoxidase é uma enzima presente em leucócitos que gera ácido hipocloroso que, embora participe do processo de defesa contra patógenos, está em maiores níveis em tecidos cerebrais de pacientes com Mal de Parkinson e Doença de Alzheimer, especialmente em placas amilóides (GELLHAAR et al., 2017; GREEN et al., 2004). Em camundongos transgênicos como modelo de Doença de Alzheimer com déficit de mieloperoxidase notou-se uma melhora de aprendizado e de memória espacial assim como a memória associativa (VOLKMAN et al., 2019). Neutrófilos podem ainda se aderir a vasculatura cerebral, gerando estresse oxidativo localizado e podendo levar também ao enfraquecimento da barreira hematoencefálica (SMYTH et al., 2022). Finalmente, é importante frisar que o estresse oxidativo leva a um “ciclo vicioso” – o excesso de radicais livres leva ao aumento da formação de β-amiloide e Tau hiperfosforilada, promovendo peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, resultando em defeitos na manutenção de cálcio intracelular, causando uma maior produção de espécies reativas e dano celular. Este dano levará novamente à inflamação, gerando ainda mais radicais livres até que o aporte antioxidante consiga impedir as reações radicalares dos vários mecanismos de estresse oxidativo concomitantes (BUTTERFIELD; HALLIWELL, 2019; TÖNNIES; TRUSHINA, 2017; TRAMUTOLA et al., 2017).



**Figura 2.** Representação das vias do estresse oxidativo e alterações fisiológicas relacionadas à deposição de proteína  $\beta$ -amiloide. Adaptado de TÖNNIES e TRUSHINA (2017).

## 2.5. Tratamentos farmacológicos clinicamente disponíveis

Os medicamentos utilizados na clínica para o tratamento da Doença de Alzheimer baseiam-se em duas teorias: a teoria colinérgica, onde há a elevada morte de neurônios colinérgicos (FISHMAN et al., 1986), sendo necessário um aumento no aporte de acetilcolina utilizando-se agentes anticolinesterásicos; e a teoria glutamatérgica, onde o excesso de glutamato poderia ser amenizado pelo uso de antagonistas de receptores glutamatérgicos.

Os medicamentos anticolinesterásicos atuam através da inibição da enzima que inativa a acetilcolina, a acetilcolinesterase – logo, reduzindo os impactos da reduzida concentração deste neurotransmissor na Doença de Alzheimer. Atualmente, os mais utilizados terapêuticamente são a rivastigmina, galantamina e o donepezil, embora o primeiro aprovado para o tratamento da patologia pela Food and Drug Administration – EUA tivesse sido a tacrina (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1997, 2000, 2001, 1997).

A tacrina foi o primeiro fármaco aprovado para o tratamento da Doença de Alzheimer, sendo sua carta de aprovação liberada em 1997 (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1997). Este medicamento demonstrou ter leves benefícios cognitivos. Contudo, possuía uma significativa taxa de não-adesão ao tratamento por conta dos seus efeitos colaterais (QIZILBASH et al., 1998). Adicionalmente, notou-se que a tacrina resultava em aumento do nível de enzimas hepáticas séricas advindo de metabólitos tóxicos após o metabolismo hepático pelo citocromo P450 (PATOCKA; JUN; KUCA, 2008; WILCOCK et al., 1993), levando então à descontinuação de seu uso.

A rivastigmina e a galantamina são dois agentes anticolinesterásicos de uso contemporâneo para o tratamento da Doença de Alzheimer, e possuem um melhor perfil de aceitabilidade que a tacrina. Contudo ainda podem causar desconfortos gastrointestinais, como pirose e cólicas abdominais, devido à exacerbação da atividade colinérgica periférica (BIRKS; CHONG; EVANS, 2015; LOY; SCHNEIDER, 2006). A rivastigmina demonstrou causar uma melhora leve no quadro cognitivo e nas atividades de rotina, enquanto a galantamina apresenta ter melhora significativa no cotidiano e na capacidade cognitiva (BIRKS; CHONG; EVANS, 2015; LOY; SCHNEIDER, 2006).

O donepezil é o fármaco anticolinesterásico mais utilizado em comparação aos demais para este fim terapêutico. Em comparação aos demais ele induz menos efeitos colaterais comparável ao placebo e não demonstrou causar alterações em sinais vitais ou em ensaios bioquímicos (ROGERS; FRIEDHOFF, 1996).

Ao serem comparados entre si, o donepezil tem menor índice de não-adesão e melhor eficácia global. Entretanto, nenhum dos três fármacos acima mencionados melhora os sintomas neuropsiquiátricos avaliados, como disforia, ansiedade, impulsividade ou irritabilidade (BLANCO-



SILVENTE et al., 2017). Embora tenha sido mencionado em alguns estudos a não melhora do estado psiquiátrico dos pacientes, há resultados conflitantes entre revisões sobre a melhora ou não dos quadros neuropsiquiátricos com agentes anticolinesterásicos (KOBAYASHI et al., 2016; TRINH et al., 2003; WANG et al., 2015a).

Para a abordagem glutamatérgica, o único fármaco disponível é a memantina. Seu mecanismo de ação é o antagonismo não-competitivo de receptores NMDA, que seriam estimulados excessivamente pelo glutamato quando há acúmulo de  $\beta$ -amiloide (ALAM et al., 2017; JOHNSON; KOTERMANSKI, 2006). O percentual de efeitos adversos não aparenta ser discrepante dos grupos placebo, indicando uma alta tolerabilidade do fármaco. Entretanto, efeitos adversos como náuseas, vômitos, diarreia, anorexia, tontura e depressão foram associados ao uso de memantina (LI et al., 2019).

A memantina causa uma leve melhora apenas aos pacientes em estágio moderado ou de baixa severidade, contudo estes dados são conflitantes entre autores (BLANCO-SILVENTE et al., 2017; DOU et al., 2018; MCSHANE et al., 2019). Existem estudos que apontam a eficiência da combinação da memantina e um inibidor de acetilcolinesterase, como o donepezil, na melhora do quadro clínico, porém com certos efeitos colaterais. Esta combinação desaceleraria o desenvolvimento dos sintomas apenas (CHEN et al., 2017; DUBOIS et al., 2007; GUO et al., 2020).

Como pode ser visto, existem poucas alternativas terapêuticas para tratamento da Doença de Alzheimer, sendo que apresentam efeitos colaterais aparentes e nenhuma delas é capaz de interromper o processo de morte neural, o que torna a sua eficácia muito limitada. Neste sentido, a caracterização e desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas são necessários para aumentar o arsenal terapêutico com substâncias verdadeiramente eficazes para o controle da doença.

## 2.6. Potencial de novas drogas anti-inflamatórias e antioxidantes para tratamento

Como explicado anteriormente, um componente marcante da Doença de Alzheimer é a inflamação. De fato, já foram observadas relações do aumento de citocinas pró-inflamatórias periféricas (como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e o grau da doença (LAI et al., 2017). Na Doença de Alzheimer, diferente de casos de déficit cognitivo leve, a neuroinflamação abrange todos os tecidos cerebrais e com maior intensidade, correlacionada a um maior declínio cognitivo especialmente na região parietal (BRADBURN; MURGATROYD; RAY, 2019).

Em relação a abordagem antioxidante, percebe-se que embora relacionada à neuroinflamação devido ao efeito cascata desta patologia, esta ocorre concomitante à inflamação e não como consequência. Conseqüentemente, agentes antioxidantes, então, poderiam mitigar o dano celular. Estudos epidemiológicos preliminares indicaram a possibilidade de anti-inflamatórios reduzirem a velocidade do desenvolvimento da Doença de Alzheimer (MCGEER; ROGERS, 1992; STEWART et al., 1997).

Por exemplo, a vitamina E, especialmente na forma  $\alpha$ -tocoferol, já foi estudada devido ao seu efeito antioxidante bem elucidado. Porém, seus resultados não são conclusivos em relação ao aumento ou não de mortalidade, embora haja uma correlação entre baixos níveis de vitamina E no líquido cefalorraquidiano ou plasma e risco do desenvolvimento da Doença de Alzheimer (BROWNE et al., 2019; FARINA et al., 2017).

Muitos compostos naturais possuem atividade antioxidante e/ou anti-inflamatória, como a classe dos polifenóis, incluindo compostos como a curcumina, silimarina e resveratrol. Embora muitos compostos de origem natural possuam potencial atividade antioxidante e/ou anti-inflamatória contra a Doença de Alzheimer, eles são muitas vezes pouco biodisponíveis ou possuem problemas para atravessar a barreira hematoencefálica, sendo um óbvio obstáculo para ensaios e tratamentos clínicos (CHEN et al., 2021; JURCAU, 2021).

Neste sentido, compostos de origem fitoquímica são uma importante fonte de potenciais novos fármacos, sendo utilizados até hoje na descoberta de novas substâncias. Desde 1981 até 2019, 506 de 1394 pequenas moléculas de potencial farmacológico, ou seja, cerca de 36% destas tiveram ao menos inspiração em produtos naturais. Para a Doença de Alzheimer foram desenvolvidos 6 compostos, sendo 3 deles sintéticos porém com grupo farmacofórico inspirado em moléculas naturais (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Duas das principais classes de compostos com atividade biológica encontrados em plantas é a das lignanas e neolignanas. Elas possuem uma ampla gama de efeitos farmacológicos, tais como atividades anti-inflamatória, citotóxica, antioxidante e antimicrobiana. Por exemplo, neoligninas

contendo o núcleo tetrahydrofurano ou 7,7'-lignanas demonstraram atividade antioxidante em concentrações de cerca de 1.1  $\mu$ M (BERTRAND TEPONNO; KUSARI; SPITELLER, 2016).

A grandisina, uma neolignana de núcleo tetrahydrofurano obtida da planta *Virola surinamensis* já foi caracterizada pela atividade antioxidante através de seu metabólito 4-O-desmetilgrandisina, auxiliando em atividade citoprotetora contra o agente ciclofosfamida (VALADARES et al., 2011).

Adicionalmente, a grandisina não desmetilada proporcionou atividade anti-nociceptiva observada através de contorções abdominais por ácido acético em camundongos e pelo teste da formalina e inibiu a inflamação avaliada pelo método da peritonite por carragenina e edema de orelha por óleo de Croton (CARVALHO et al., 2010).

Em um modelo utilizando cultura de neurônios corticais de rato, observou-se que compostos neolignanas 2,5-diaril-3,4-dimetiltetrahydrofuranos promoveram o crescimento de projeções neuronais, demonstrando efeitos neurotróficos. Além disso, tais compostos foram capazes de aumentar a viabilidade de neurônios hipocámpais que foram incubados com a proteína amilóide A $\beta$ <sub>25-35</sub>, revelando também um efeito neuroprotetor (ZHAI et al., 2005).

Com os dados apresentados aqui nota-se que a grandisina é um composto natural de grande interesse, sendo uma molécula apropriada como base para outras pesquisas para doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer. Além disso, a estrutura da grandisina permite a modificação molecular para a síntese de novos compostos com propriedades mais vantajosas em relação ao composto original.

## 2.7. Bioisosterismo como estratégia para produção de novas drogas

A fim de se desenvolver um novo fármaco, uma metodologia muito utilizada é a de bioisosterismo. Ao escolher uma molécula líder que apresente boas propriedades químicas e biológicas, sabendo-se seu mecanismo de ação ou seus efeitos farmacológicos, e preferencialmente seu grupo farmacofórico, pode-se modificá-la para melhorar sua atividade farmacológica, se tornando mais seletiva a certos alvos e melhorar também sua farmacocinética, isto é, a sua absorção, distribuição, metabolização e sua eliminação (LIMA; BARREIRO, 2005).

No bioisosterismo, existem duas abordagens para modificação molecular: o bioisosterismo clássico e o bioisosterismo não-clássico. No bioisosterismo clássico, grupos funcionais com elétrons de valência iguais, como CH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub> e OH ou moléculas equivalentes em anéis aromáticos, como um heteroátomo em um anel aromático, permitiria que um composto com estas modificações tenham propriedades físicas e químicas semelhantes ao composto de origem utilizado, mantendo um perfil de atividade biológica semelhante entre si (THORNER, 1979).

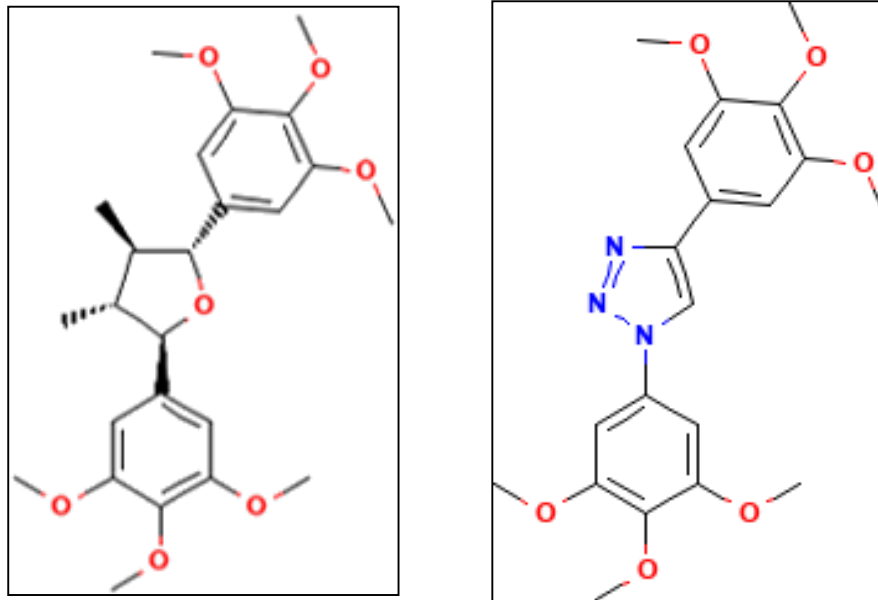
A abordagem do bioisosterismo não-clássico, contudo, não segue tão estritamente a questão de distribuição eletrônica e a estericidade. Pode-se modificar anéis, trocando grupos para serem espacialmente ou eletronicamente semelhantes, como a quebra de anéis para inserção de outros grupos; trocar grupos funcionais de lugar (retroisosterismo) ou de grupos funcionais com características físico-químicas parecidas, como os ácidos carboxílicos e sulfonamidas (LIMA; BARREIRO, 2005).

Neste sentido, no Laboratório de Química Farmacêutica do UFMS, foi sintetizado um bioisómero da grandisina, no qual o seu anel central tetrahydrofurano foi substituído por um grupo 1,2,3-triazol, originando o análogo triazólico da grandisina (AGT, Figura 3). Este grupo funcional confere a moléculas atividades biológicas variadas, incluindo atividade antimicrobiana, antituberculose, anti-inflamatória e neuroprotetora (AGALAVE; MAUJAN; PORE, 2011; BOZOROV; ZHAO; AISA, 2019). Outra vantagem deste grupo triazólico é sua síntese: ele é produzido através da chamada *click chemistry*, uma rota sintética rápida e simples onde há altos rendimentos de produto (KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001), levando Sharpless a ganhar o Prêmio Nobel de Química de 2022 por sua publicação.

Além disso, a substituição do grupo tetrahydrofurânico da grandisina por um triazol melhorou a sua solubilidade em solventes inertes sem atividade biológica, permitindo a sua solubilização e realização de estudos *in vivo* com estes derivados.

Apesar do conhecimento do potencial neuroprotetor e neurotrófico *in vitro* de neolignanais, nenhuma dessas moléculas foi testada em um modelo animal da Doença de Alzheimer. Adicionalmente, dados não publicados demonstram que o AGT é ainda mais potente e mais solúvel

do que o composto original. Assim, a hipótese do presente trabalho é a de que o tratamento repetido com AGT poderia induzir efeitos neuroprotetores em animais que receberam a injeção intracerebroventricular de oligômeros da proteína  $\beta$ -amiloide.



**Figura 3.** Representação da molécula da grandisina (**a esquerda**) e a modificação molecular realizada, levando a grandisina triazol (**a direita**).

### 3. JUSTIFICATIVA

Na atualidade, existem pouquíssimas opções terapêuticas disponíveis na clínica para tratamento da Doença de Alzheimer. Além disso, tais opções possuem várias limitações no que se refere aos efeitos clínicos esperados, uma vez que podem perder sua eficácia à medida que a doença avança, além do elevado perfil de efeitos colaterais. Adicionalmente, a gravidade e a dificuldade no tratamento de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer, mostram a necessidade da busca de novos fármacos com efeitos neuroprotetores e com um perfil de segurança mais vantajoso.

Compostos fitoquímicos são potenciais agentes neuroprotetores, devido à suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Este parece ser o caso de neolignananas tetraidrofurâncias como a grandisina. Entretanto, produtos naturais apresentam determinados inconvenientes para o teste em modelos *in vivo*, tal como a solubilidade em veículos inertes que permitam o teste. Assim sendo se faz necessária a modificação molecular para a síntese de compostos com propriedades mais vantajosas. Uma destas técnicas é o bioisosterismo, que consiste na síntese de moléculas com ineditismo estrutural a partir substâncias com estrutura definida, nas quais um grupo químico é trocado por outro com distribuição eletrônica e conformação semelhantes, o que permite a identificação e avaliação de novos compostos com perfil farmacológico desejado. Neste sentido, o núcleo tetraidrofurânico da grandisina foi substituído por um núcleo triazólico, rendendo o análogo triazólico da grandisina (AGT).

Apesar de neolignananas como o AGT possuírem efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e até mesmo neurotróficos e neuroprotetores *in vitro*, seus efeitos ainda não foram avaliados em um modelo animal da Doença de Alzheimer. Portanto, o presente projeto se propõe a caracterizar os possíveis efeitos neuroprotetores do tratamento repetido com AGT em camundongos submetidos à injeção intracerebroventricular da proteína  $\beta$ -amiloide.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Avaliar os possíveis efeitos neuroprotetores do tratamento repetido com AGT em camundongos C57/Bl6 submetidos à injeção intracerebroventricular da proteína  $\beta$ A.

### **4.2 Objetivos Específicos**

**4.2.1** – Mensurar o efeito do tratamento repetido com o AGT, sobre a memória de reconhecimento e localização em camundongos com deposição de  $\beta$ -amiloide, pela injeção intracerebroventricular desta proteína ou do respectivo veículo.

**4.2.2** – Avaliar o efeito do tratamento repetido com o AGT sobre o nível de expressão de substâncias envolvidas em processos neurotóxicos, inflamatórios e oxidantes, tais como TNF- $\alpha$ , INF, IL-6 bem como a peroxidação lipídica, carbonilação proteica e atividade da mieloperoxidase no CPFM e/ou Hpc de camundongos com deposição de  $\beta$ A, pela injeção intracerebroventricular desta proteína ou do respectivo veículo.

**4.2.3**- Avaliar o possível efeito do AGT sobre a prevenção do prejuízo cognitivo persistente em camundongos que receberam injeção de  $\beta$ -amiloide e comparar tais efeitos com a memantina, uma droga clínica, utilizada como controle positivo.

## 5. REFERÊNCIAS

- 2022 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 18, n. 4, p. 700–789, 2022.
- A. ARMSTRONG, R. Risk factors for Alzheimer's disease. **Folia Neuropathologica**, v. 57, n. 2, p. 87–105, 2019.
- AGALAVE, S. G.; MAUJAN, S. R.; PORE, V. S. Click Chemistry: 1,2,3-Triazoles as Pharmacophores. **Chemistry – An Asian Journal**, v. 6, n. 10, p. 2696–2718, 2011.
- AHMED, R. R. et al. BACE1 and BACE2 enzymatic activities in Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 112, n. 4, p. 1045–1053, 2010.
- ALAM, S. et al. **Classics in Chemical Neuroscience: Memantine**. review-article. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acschemneuro.7b00270>>. Acesso em: 1 jan. 2023.
- ALLADI, S.; HACHINSKI, V. World dementia: One approach does not fit all. **Neurology**, v. 91, n. 6, p. 264–270, 7 ago. 2018.
- ALTMANN, A. et al. Sex modifies the APOE-related risk of developing Alzheimer disease. **Annals of Neurology**, v. 75, n. 4, p. 563–573, abr. 2014.
- ALZHEIMER, A. Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters: (On certain peculiar diseases of old age. **History of Psychiatry**, v. 2, n. 5, p. 74–101, mar. 1911.
- BATEMAN, R. J. et al. Human amyloid- $\beta$  synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. **Nature Medicine**, v. 12, n. 7, p. 856–861, jul. 2006.
- BERTRAND TEPONNO, R.; KUSARI, S.; SPITELLER, M. Recent advances in research on lignans and neolignans. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 9, p. 1044–1092, 2016.
- BIRKS, J. S.; CHONG, L.-Y.; EVANS, J. G. Rivastigmine for Alzheimer's disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 9, 2015.
- BLANCO-SILVENTE, L. et al. Discontinuation, Efficacy, and Safety of Cholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease: a Meta-Analysis and Meta-Regression of 43 Randomized Clinical Trials Enrolling 16 106 Patients. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 7, p. 519–528, 1 jul. 2017.
- BOTS, S. H.; PETERS, S. A. E.; WOODWARD, M. Sex differences in coronary heart disease and stroke mortality: a global assessment of the effect of ageing between 1980 and 2010. **BMJ Global Health**, v. 2, n. 2, p. e000298, 1 mar. 2017.
- BOWEN, D. M. et al. Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. **Brain**, v. 99, n. 3, p. 459–496, 1976.
- BOZOROV, K.; ZHAO, J.; AISA, H. A. 1,2,3-Triazole-containing hybrids as leads in medicinal chemistry: A recent overview. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 16, p. 3511–3531, 15 ago. 2019.
- BRADBURN, S.; MURGATROYD, C.; RAY, N. Neuroinflammation in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: A meta-analysis. **Ageing Research Reviews**, v. 50, p. 1–8, 1 mar. 2019.
- BRANNAN, T. S.; MAKER, H. S.; RAES, I. P. Regional distribution of catalase in the adult rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 36, n. 1, p. 307–309, jan. 1981.
- BRITO-MOREIRA, J. et al. A $\beta$  oligomers induce glutamate release from hippocampal neurons. **Current Alzheimer Research**, v. 8, n. 5, p. 552–562, ago. 2011.
- BROWNE, D. et al. Vitamin E and Alzheimer's disease: what do we know so far? **Clinical Interventions in Aging**, v. 14, p. 1303–1317, 18 jul. 2019.
- BUTTERFIELD, D. A.; HALLIWELL, B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 20, n. 3, p. 148–160, mar. 2019.
- CAO, M. et al. Identification of age- and gender-associated long noncoding RNAs in the human brain with Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 81, p. 116–126, set. 2019.
- Caregiving in the U.S. - 2020 Report**. , maio 2020.
- CARVALHO, A. A. V. et al. Antinociceptive and antiinflammatory activities of grandisin extracted



- from *Virola surinamensis*. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 1, p. 113–118, jan. 2010.
- CDC WONDER - Underlying Cause of Death, 1999-2020**. U.S. Department of Health & Human Services, Center for Disease Control and Prevention (CDC), , 2020. . Acesso em: 14 dez. 2022
- CHASSEIGNEAUX, S. et al. Secreted amyloid precursor protein  $\beta$  and secreted amyloid precursor protein  $\alpha$  induce axon outgrowth in vitro through Egr1 signaling pathway. **PloS One**, v. 6, n. 1, p. e16301, 27 jan. 2011.
- CHEN, R. et al. Treatment effects between monotherapy of donepezil versus combination with memantine for Alzheimer disease: A meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0183586, 21 ago. 2017.
- CHEN, X. et al. Neuroprotective Natural Products for Alzheimer’s Disease. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1309, 25 maio 2021.
- CIRRITO, J. R. et al. Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. **Neuron**, v. 48, n. 6, p. 913–922, 22 dez. 2005.
- CORDER, E. H. et al. Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer’s Disease in Late Onset Families. **Science**, v. 261, n. 5123, p. 921–923, 13 ago. 1993.
- CRIMMINS, E. M. et al. Educational Differences in the Prevalence of Dementia and Life Expectancy with Dementia: Changes from 2000 to 2010. **The Journals of Gerontology: Series B**, v. 73, n. suppl\_1, p. S20–S28, 16 abr. 2018.
- CUMMINGS, J. L.; TONG, G.; BALLARD, C. Treatment Combinations for Alzheimer’s Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options. **Journal of Alzheimer’s Disease**, v. 67, n. 3, p. 779–794, 12 fev. 2019.
- DAVIES, P.; MALONEY, A. J. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer’s disease. **Lancet (London, England)**, v. 2, n. 8000, p. 1403, 25 dez. 1976.
- DE BONI, U.; MCLACHLAN, D. R. C. Controlled induction of paired helical filaments of the Alzheimer type in cultured human neurons, by glutamate and aspartate. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 68, n. 2–3, p. 105–118, maio 1985.
- DEANE, R. et al. apoE isoform–specific disruption of amyloid  $\beta$  peptide clearance from mouse brain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 12, p. 4002–4013, 1 dez. 2008.
- DHURIYA, Y. K.; SHARMA, D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 199, 6 jul. 2018.
- DOU, K.-X. et al. Comparative safety and effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for Alzheimer’s disease: a network meta-analysis of 41 randomized controlled trials. **Alzheimer’s Research & Therapy**, v. 10, n. 1, 27 dez. 2018.
- DUBOIS, B. et al. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer’s disease: revising the NINCDS–ADRDA criteria. **The Lancet Neurology**, v. 6, n. 8, p. 734–746, ago. 2007.
- EDWARDS III, G. A. et al. Modifiable Risk Factors for Alzheimer’s Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 11, p. 146, 24 jun. 2019.
- EEDE, P. et al. Interleukin-12/23 deficiency differentially affects pathology in male and female Alzheimer’s disease-like mice. **EMBO reports**, v. 21, n. 3, p. e48530, 4 mar. 2020.
- ESCH, F. S. et al. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. **Science (New York, N.Y.)**, v. 248, n. 4959, p. 1122–1124, 1 jun. 1990.
- FARINA, N. et al. Vitamin E for Alzheimer’s dementia and mild cognitive impairment. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 4, n. 4, p. CD002854, 18 abr. 2017.
- FENTON, H. J. H. 16 Oxidation of Tartatic Acid in Presence of Iron. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 65, n. 0, p. 899–910, 1894.
- FETER, N. et al. Ten-year trends in hospitalizations due to Alzheimer’s disease in Brazil: a national-based study. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, n. 8, p. e00073320, 2021.
- FISHMAN, E. B. et al. Distribution of the molecular forms of acetylcholinesterase in human brain: alterations in dementia of the Alzheimer type. **Annals of Neurology**, v. 19, n. 3, p. 246–252, mar. 1986.

- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Cognex Approval Letter**. , 10 out. 1997.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Aricept (Donepezil HCL) Oral Tabs 5/10MG**. , 4 nov. 1997. Disponível em: <[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/97/020690Orig1s000rev.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/97/020690Orig1s000rev.pdf)>
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Exelon Approval Letter**. , 2000.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Reminyl Approval Letter**. , 28 fev. 2001.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Namenda Approval Letter**. , 16 out. 2003.
- FUKUMOTO, H. et al.  $\beta$ -Secretase Activity Increases with Aging in Human, Monkey, and Mouse Brain. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 2, p. 719–725, 1 fev. 2004.
- FURUKAWA, K. et al. Increased Activity-Regulating and Neuroprotective Efficacy of  $\alpha$ -Secretase-Derived Secreted Amyloid Precursor Protein Conferred by a C-Terminal Heparin-Binding Domain. **Journal of Neurochemistry**, v. 67, n. 5, p. 1882–1896, 1996.
- GELLHAAR, S. et al. Myeloperoxidase-immunoreactive cells are significantly increased in brain areas affected by neurodegeneration in Parkinson’s and Alzheimer’s disease. **Cell and Tissue Research**, v. 369, n. 3, p. 445–454, set. 2017.
- GOEDERT, M.; GHETTI, B. Alois Alzheimer: His Life and Times. **Brain Pathology**, v. 17, n. 1, p. 57–62, jan. 2007.
- GREEN, P. S. et al. Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer’s disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 90, n. 3, p. 724–733, ago. 2004.
- GREENAMYRE, J. T. et al. Glutamate transmission and toxicity in alzheimer’s disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 12, n. 4, p. 421-IN4, jan. 1988.
- GUO, J. et al. Memantine, Donepezil, or Combination Therapy—What is the best therapy for Alzheimer’s Disease? A Network Meta-Analysis. **Brain and Behavior**, v. 10, n. 11, p. e01831, 2020.
- GYENGESI, E. et al. Chronic Microglial Activation in the GFAP-IL6 Mouse Contributes to Age-Dependent Cerebellar Volume Loss and Impairment in Motor Function. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, 2019.
- HALLIWELL, B. Role of Free Radicals in the Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Implications for Antioxidant Treatment. **Drugs & Aging**, v. 18, n. 9, p. 685–716, 2001.
- HARDINGHAM, G. E.; FUKUNAGA, Y.; BADING, H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 5, p. 405–414, maio 2002.
- HENSLEY, K. et al. Brain regional correspondence between Alzheimer’s disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. **Journal of Neurochemistry**, v. 65, n. 5, p. 2146–2156, nov. 1995.
- HETMAN, M.; KHAREBAVA, G. Survival signaling pathways activated by NMDA receptors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 8, p. 787–799, 2006.
- HIPPIUS, H.; NEUNDÖRFER, G. The discovery of Alzheimer’s disease. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 101–108, 31 mar. 2003.
- IKONOMIDOU, C.; STEFOVSKA, V.; TURSKI, L. Neuronal death enhanced by N-methyl-d-aspartate antagonists. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 23, p. 12885–12890, 7 nov. 2000.
- ITAGAKI, S. et al. Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. **Journal of Neuroimmunology**, v. 24, n. 3, p. 173–182, out. 1989.
- JANG, B. G. et al. Beta-amyloid oligomers induce early loss of presynaptic proteins in primary neurons by caspase-dependent and proteasome-dependent mechanisms. **Neuroreport**, v. 25, n. 16, p. 1281–1288, 12 nov. 2014.
- JANSEN, I. E. et al. Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer’s disease risk. **Nature Genetics**, v. 51, n. 3, p. 404–413, mar. 2019.
- JARRETT, J. T.; LANSBURY, P. T. Seeding “one-dimensional crystallization” of amyloid: A

- pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? **Cell**, v. 73, n. 6, p. 1055–1058, 18 jun. 1993.
- JAYARAMAN, A. et al. TNF-mediated neuroinflammation is linked to neuronal necroptosis in Alzheimer's disease hippocampus. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 9, n. 1, p. 159, dez. 2021.
- JEGANATHAN, S. et al. The Natively Unfolded Character of Tau and Its Aggregation to Alzheimer-like Paired Helical Filaments. **Biochemistry**, v. 47, n. 40, p. 10526–10539, 7 out. 2008.
- JOHNSON, J. W.; KOTERMANSKI, S. E. Mechanism of action of memantine. **Current Opinion in Pharmacology, Neurosciences**. v. 6, n. 1, p. 61–67, 1 fev. 2006.
- JOURDI, H. et al. Positive AMPA Receptor Modulation Rapidly Stimulates BDNF Release and Increases Dendritic mRNA Translation. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 27, p. 8688–8697, 8 jul. 2009.
- JURCAU, A. The Role of Natural Antioxidants in the Prevention of Dementia—Where Do We Stand and Future Perspectives. **Nutrients**, v. 13, n. 2, p. 282, 20 jan. 2021.
- KATZMAN, R. The Prevalence and Malignancy of Alzheimer Disease: A Major Killer. **Archives of Neurology**, v. 33, n. 4, p. 217–218, 1 abr. 1976.
- KIDD, M. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. **Nature**, v. 197, p. 192–193, 12 jan. 1963.
- KIRSCHNER, D. A.; ABRAHAM, C.; SELKOE, D. J. X-ray diffraction from intraneuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross-beta conformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 2, p. 503–507, jan. 1986.
- KOBAYASHI, H. et al. The comparative efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a Bayesian network meta-analysis. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 31, n. 8, p. 892–904, 2016.
- KOENIGSKNECHT, J.; LANDRETH, G. Microglial phagocytosis of fibrillar beta-amyloid through a beta1 integrin-dependent mechanism. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 44, p. 9838–9846, 3 nov. 2004.
- KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. **Angewandte Chemie (International Ed. in English)**, v. 40, n. 11, p. 2004–2021, 1 jun. 2001.
- KOPAN, R.; ILAGAN, MA. X. G.  $\gamma$ -Secretase: proteasome of the membrane? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 6, p. 499–504, jun. 2004.
- LAI, K. S. P. et al. Peripheral inflammatory markers in Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis of 175 studies. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 88, n. 10, p. 876–882, 2017.
- LAZAREVIC, V. et al. Physiological Concentrations of Amyloid Beta Regulate Recycling of Synaptic Vesicles via Alpha7 Acetylcholine Receptor and CDK5/Calcineurin Signaling. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, 2017.
- LEE, S. H. et al. APP Family Regulates Neuronal Excitability and Synaptic Plasticity but Not Neuronal Survival. **Neuron**, v. 108, n. 4, p. 676–690.e8, nov. 2020.
- LEISSRING, M. A. et al. Enhanced Proteolysis of  $\beta$ -Amyloid in APP Transgenic Mice Prevents Plaque Formation, Secondary Pathology, and Premature Death. **Neuron**, v. 40, n. 6, p. 1087–1093, 18 dez. 2003.
- LI, D.-D. et al. Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials on the Efficacy and Safety of Donepezil, Galantamine, Rivastigmine, and Memantine for the Treatment of Alzheimer's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, 2019.
- LIAO, Y.-F. et al. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ , and Interferon- $\gamma$  Stimulate  $\gamma$ -Secretase-mediated Cleavage of Amyloid Precursor Protein through a JNK-dependent MAPK Pathway \*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 47, p. 49523–49532, 19 nov. 2004.

- LIMA, L.; BARREIRO, E. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23–49, 1 jan. 2005.
- LOY, C.; SCHNEIDER, L. Galantamine for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 1, 2006.
- LYRA E SILVA, N. M. et al. Pro-inflammatory interleukin-6 signaling links cognitive impairments and peripheral metabolic alterations in Alzheimer's disease. **Translational Psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 28 abr. 2021.
- MATOS, M. et al. Amyloid-beta peptide decreases glutamate uptake in cultured astrocytes: Involvement of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase cascades. **Neuroscience**, v. 156, n. 4, p. 898–910, 28 out. 2008.
- MATTSON, M. P. et al. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. **Neuron**, v. 10, n. 2, p. 243–254, fev. 1993.
- MCGEER, P. L.; ROGERS, J. Anti-inflammatory agents as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 42, n. 2, p. 447–447, fev. 1992.
- MCSHANE, R. et al. Memantine for dementia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2019, n. 3, p. 1–446, 2019.
- MELO, S. C. DE et al. Dementias in Brazil: increasing burden in the 2000–2016 period. Estimates from the Global Burden of Disease Study 2016. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 78, n. 12, p. 762–771, dez. 2020.
- MIKKOLA, T. S. et al. Sex Differences in Age-Related Cardiovascular Mortality. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e63347, 20 maio 2013.
- MINERS, J. S. et al. A $\beta$ -Degrading Enzymes: Potential for Treatment of Alzheimer Disease. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 70, n. 11, p. 944–959, 1 nov. 2011.
- MORRIS, M. et al. The Many Faces of Tau. **Neuron**, v. 70, n. 3, p. 410–426, 12 maio 2011.
- MUKRASCH, M. D. et al. Structural Polymorphism of 441-Residue Tau at Single Residue Resolution. **PLOS Biology**, v. 7, n. 2, p. e1000034, 17 fev. 2009.
- MÜLLER, U. C.; DELLER, T.; KORTE, M. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 5, p. 281–298, maio 2017.
- NANI, A. et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential of Polyphenols Contained in Mediterranean Diet in Obesity: Molecular Mechanisms. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 4, p. 985, 12 fev. 2021.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 27 mar. 2020.
- NICHOLS, E. et al. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet Public Health**, v. 7, n. 2, p. e105–e125, 2022.
- ONO, K.; CONDRON, M. M.; TEPLow, D. B. Structure-neurotoxicity relationships of amyloid beta-protein oligomers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 35, p. 14745–14750, 1 set. 2009.
- ONO, K.; WATANABE-NAKAYAMA, T. Aggregation and structure of amyloid  $\beta$ -protein. **Neurochemistry International**, v. 151, p. 105208, dez. 2021.
- PAN, X. et al. Microglial phagocytosis induced by fibrillar  $\beta$ -amyloid is attenuated by oligomeric  $\beta$ -amyloid: implications for Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 6, n. 1, p. 45, 30 jun. 2011.
- PAPADIA, S. et al. Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defences. **Nature neuroscience**, v. 11, n. 4, p. 476–487, abr. 2008.
- PATOCKA, J.; JUN, D.; KUČA, K. Possible role of hydroxylated metabolites of tacrine in drug toxicity and therapy of Alzheimer's disease. **Current Drug Metabolism**, v. 9, n. 4, p. 332–

335, maio 2008.

- PETKOVA, A. T. et al. A structural model for Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 26, p. 16742–16747, 24 dez. 2002.
- PIRTTIMAKI, T. M. et al.  $\alpha 7$  Nicotinic receptor-mediated astrocytic gliotransmitter release: A $\beta$  effects in a preclinical Alzheimer's mouse model. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e81828, 2013.
- PLANT, L. D. et al. The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 13, p. 5531–5535, 2 jul. 2003.
- POHL, D. et al. N-Methyl-d-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 5, p. 2508–2513, 2 mar. 1999.
- PUZZO, D. et al. Picomolar Amyloid- $\beta$  Positively Modulates Synaptic Plasticity and Memory in Hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 53, p. 14537–14545, 31 dez. 2008.
- PUZZO, D. et al. Endogenous amyloid- $\beta$  is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. **Annals of Neurology**, v. 69, n. 5, p. 819–830, 2011.
- QIZILBASH, N. et al. Cholinesterase inhibition for Alzheimer disease: a meta-analysis of the tacrine trials. Dementia Trialists' Collaboration. **JAMA**, v. 280, n. 20, p. 1777–1782, 25 nov. 1998.
- RAJAN, K. B. et al. Prevalence and incidence of clinically diagnosed Alzheimer's disease dementia from 1994 to 2012 in a population study. **Alzheimer's & Dementia**, v. 15, n. 1, p. 1–7, jan. 2019.
- RAJAN, K. B. et al. Population estimate of people with clinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment in the United States (2020–2060). **Alzheimer's & Dementia**, v. 17, n. 12, p. 1966–1975, dez. 2021.
- REIMAN, E. M. et al. Alzheimer's Disease: Implications of the Updated Diagnostic and Research Criteria: (CME Commentary). **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 72, n. 09, p. 1190–1196, 15 set. 2011.
- RIES, M.; SASTRE, M. Mechanisms of A $\beta$  Clearance and Degradation by Glial Cells. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 8, 2016.
- RIZZI, L.; ROSSET, I.; RORIZ-CRUZ, M. Global Epidemiology of Dementia: Alzheimer's and Vascular Types. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–8, 2014.
- ROCHA DE ALMEIDA, C.; CALMON NOGUEIRA DA GAMA PEREIRA, A. B. Análise do panorama epidemiológico brasileiro da Doença de Alzheimer de 2008 a outubro de 2020. **Revista de Saúde**, v. 13, n. 1, p. 54–60, 2022.
- ROGERS, J. et al. Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: Relationship to the pathology of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 9, p. 339–349, jan. 1988.
- ROGERS, J. et al. Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 43, n. 8, p. 1609–1609, 1 ago. 1993.
- ROGERS, S. L.; FRIEDHOFF, L. T. The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. The Donepezil Study Group. **Dementia (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 6, p. 293–303, 1996.
- RUDOLPH, J. L. et al. Hospitalization in community-dwelling persons with Alzheimer's disease: frequency and causes. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 58, n. 8, p. 1542–1548, ago. 2010.
- RUDY, C. C. et al. The Role of the Tripartite Glutamatergic Synapse in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease. **Aging and disease**, v. 6, n. 2, p. 131, 2015.
- SAIDO, T.; LEISSRING, M. A. Proteolytic Degradation of Amyloid  $\beta$ -Protein. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 6, p. a006379, 1 jun. 2012.
- SATIZABAL, C. L. et al. Incidence of Dementia over Three Decades in the Framingham Heart Study.

- New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 6, p. 523–532, 11 fev. 2016.
- SCHELTENS, P. et al. Alzheimer's disease. **Lancet (London, England)**, v. 397, n. 10284, p. 1577–1590, 24 abr. 2021.
- SCIMEMI, A. et al. Amyloid- $\beta$ 1–42 Slows Clearance of Synaptically Released Glutamate by Mislocalizing Astrocytic GLT-1. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 12, p. 5312–5318, 20 mar. 2013.
- SENECHAL, Y.; KELLY, P. H.; DEV, K. K. Amyloid precursor protein knockout mice show age-dependent deficits in passive avoidance learning. **Behavioural Brain Research**, v. 186, n. 1, p. 126–132, jan. 2008.
- SHAW, C. et al. Evaluation of Selective Survival and Sex/Gender Differences in Dementia Incidence Using a Simulation Model. **JAMA Network Open**, v. 4, n. 3, p. e211001, 9 mar. 2021.
- SIMPSON, D. S. A.; OLIVER, P. L. ROS Generation in Microglia: Understanding Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease. **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 743, 13 ago. 2020.
- SMYTH, L. C. D. et al. Neutrophil-vascular interactions drive myeloperoxidase accumulation in the brain in Alzheimer's disease. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 10, n. 1, p. 38, 24 mar. 2022.
- STELZMANN, R. A.; NORMAN SCHNITZLEIN, H.; REED MURTAGH, F. An english translation of alzheimer's 1907 paper, Über eine eigenartige erkankung der hirnrinde? **Clinical Anatomy**, v. 8, n. 6, p. 429–431, 1995.
- STEWART, W. F. et al. Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. **Neurology**, v. 48, n. 3, p. 626–632, mar. 1997.
- STRITTMATTER, W. J. et al. Apolipoprotein E: High-avidity binding to  $\beta$ -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. **Proc. NatL Acad. Sci. USA**, 1993.
- SVENNERHOLM, L. Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. **Journal of Lipid Research**, v. 9, n. 5, p. 570–579, set. 1968.
- SWARDFAGER, W. et al. A Meta-Analysis of Cytokines in Alzheimer's Disease. **Biological Psychiatry**, Aging, Amyloid, and Alzheimer's Disease. v. 68, n. 10, p. 930–941, 15 nov. 2010.
- TACKENBERG, C.; NITSCH, R. M. The secreted APP ectodomain sAPP $\alpha$ , but not sAPP $\beta$ , protects neurons against A $\beta$  oligomer-induced dendritic spine loss and increased tau phosphorylation. **Molecular Brain**, v. 12, n. 1, p. 27, dez. 2019.
- TALANTOVA, M. et al. A $\beta$  induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 27, p. E2518–E2527, 2 jul. 2013.
- TANAKA, S. et al. Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 165, n. 3, p. 1406–1414, 29 dez. 1989.
- TAYLOR, C. A. et al. Deaths from Alzheimer's Disease—United States, 1999–2014. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 66, n. 20, p. 521, 2017.
- TERRY, ROBERT. D. THE FINE STRUCTURE OF NEUROFIBRILLARY TANGLES IN ALZHEIMER'S DISEASE. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 22, p. 629–642, out. 1963.
- THORNBER, C. W. Isosterism and molecular modification in drug design. **Chemical Society Reviews**, v. 8, n. 4, p. 563–580, 1 jan. 1979.
- TIAN, Y.; CRUMP, C. J.; LI, Y.-M. Dual Role of  $\alpha$ -Secretase Cleavage in the Regulation of  $\gamma$ -Secretase Activity for Amyloid Production. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 42, p. 32549–32556, out. 2010.
- TÖNNIES, E.; TRUSHINA, E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 57, n. 4, p. 1105–1121, 2017.
- TORRES-ACOSTA, N. et al. Therapeutic Potential of TNF- $\alpha$  Inhibition for Alzheimer's Disease

- Prevention. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 78, n. 2, p. 619–626, 27 set. 2020.
- TRAMUTOLA, A. et al. Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. **Brain Research Bulletin**, Oxidative Stress and Neurodegeneration. v. 133, p. 88–96, 1 jul. 2017.
- TRINH, N.-H. et al. Efficacy of cholinesterase inhibitors in the treatment of neuropsychiatric symptoms and functional impairment in Alzheimer disease: a meta-analysis. **JAMA**, v. 289, n. 2, p. 210–216, 8 jan. 2003.
- TYAN, S.-H. et al. Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 51, n. 1–2, p. 43–52, ago. 2012.
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES. **What's the difference between Medicare and Medicaid?** **HHS.gov**, 8 dez. 2022. Disponível em: <<https://www.hhs.gov/answers/medicare-and-medicaid/what-is-the-difference-between-medicare-medicaid/index.html>>. Acesso em: 15 dez. 2022
- VALADARES, M. C. et al. Chemoprotective effect of the tetrahydrofuran lignan grandisin in the in-vivo rodent micronucleus assay. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 3, p. 447–451, 2011.
- VOLKMAN, R. et al. Myeloperoxidase Deficiency Inhibits Cognitive Decline in the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, p. 990, 24 set. 2019.
- VOM BERG, J. et al. Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. **Nature Medicine**, v. 18, n. 12, p. 1812–1819, dez. 2012.
- WALSH, D. M. et al. Amyloid  $\beta$ -Protein Fibrillogenesis: DETECTION OF A PROTOFIBRILLAR INTERMEDIATE \*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 35, p. 22364–22372, 29 ago. 1997.
- WANG, J. et al. Pharmacological treatment of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 86, n. 1, p. 101–109, jan. 2015a.
- WANG, W.-Y. et al. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. **Annals of Translational Medicine**, v. 3, n. 10, p. 136, jun. 2015b.
- WEINGARTEN, M. D. et al. A protein factor essential for microtubule assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 5, p. 1858–1862, maio 1975.
- WILCOCK, G. K. et al. An evaluation of the efficacy and safety of tetrahydroaminoacridine (THA) without lecithin in the treatment of Alzheimer's disease. **Age and Ageing**, v. 22, n. 5, p. 316–324, set. 1993.
- WILDSMITH, K. R. et al. Evidence for impaired amyloid  $\beta$  clearance in Alzheimer's disease. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 5, n. 4, p. 33, 2013.
- YAMAMOTO, M. et al. Interferon- $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Regulate Amyloid- $\beta$  Plaque Deposition and  $\beta$ -Secretase Expression in Swedish Mutant APP Transgenic Mice. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 2, p. 680–692, 1 fev. 2007.
- YANKNER, B. A.; DUFFY, L. K.; KIRSCHNER, D. A. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. **Science (New York, N.Y.)**, v. 250, n. 4978, p. 279–282, 12 out. 1990.
- ZHAI, H. et al. Neuroprotective Effects of 2,5-Diaryl-3,4-dimethyltetrahydrofuran Neolignans. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 2, p. 289–293, 2005.
- ZHANG, Y. et al. APP processing in Alzheimer's disease. **Molecular Brain**, v. 4, n. 1, p. 3, 2011.
- ZHAO, G. et al. Identification of a New Presenilin-dependent  $\zeta$ -Cleavage Site within the Transmembrane Domain of Amyloid Precursor Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 49, p. 50647–50650, dez. 2004.
- ZIMATKIN, S. M.; LINDROS, K. O. Distribution of catalase in rat brain: aminergic neurons as possible targets for ethanol effects. **Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)**, v. 31, n. 2, p. 167–174, mar. 1996.

## **6. TRIAZOLE GRANDISIN ANALOG PREVENTS MEMORY DEFICIT BY ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS IN AN ALZHEIMER'S DISEASE MODEL**

**Nayara Alessandra Feliciani Dias<sup>3\*</sup>, Erick Yudi Maruyama Rodrigues<sup>1\*</sup>, Victor Hugo Bitencourt Andrade<sup>1</sup>, Gabriela Felix Chaves Ferreira<sup>3</sup>, Diego Bento de Carvalho<sup>1</sup>, Paola Mayara Valente Coronel<sup>1</sup>, Murilo Kioshi Aquino Yonekawa<sup>2</sup>, Eduardo Benedetti Parisotto<sup>1</sup>, Edson dos Anjos dos Santos<sup>2</sup>, Albert Schiaveto Souza<sup>2</sup>, Edgar Julian Paredes Gamero, Kamylla Souza de Sousa; Letícia Lemes de Souza; Leonardo Resstel Barbosa Mendes<sup>4</sup>, Adriano Cesar de Moraes Baroni<sup>1\*</sup>, Davi Campos Lagatta<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Brazil

<sup>2</sup>Institute of Biosciences, Federal University of Mato Grosso do Sul (INBIO-UFMS), Campo Grande, Brazil

<sup>3</sup>School of Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Brazil

<sup>4</sup>School of Medicine of Ribeirão Preto-University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

\*These authors equally contributed to the present study.

**Acknowledgements:** this work was supported by the Laboratories of Medicinal Chemistry, Molecular Biology, Biochemistry and Hematology from Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), and Laboratory of Neuropharmacology (School of Medicine of Ribeirão Preto – University of São Paulo).

**\*Corresponding authors:** Dr. Adriano C. M. Baroni; Dr. Davi C. Lagatta

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Brazil

Phone: +55 67 3145 7781

e-mail addresses: [adriano.baroni@ufms.br](mailto:adriano.baroni@ufms.br), [davi\\_campos@ufms.br](mailto:davi_campos@ufms.br)



## Abstract

**Background and Purpose:** Alzheimer's disease is a chronic neurodegenerative disease caused by accumulation of amyloid-beta protein in cortex and hippocampus, leading to neurocognitive impairment due to neuroinflammation and oxidative stress. Current drugs for its treatment are scarce, have explicit side effects and limited efficacy over the disease progression. In this study, we evaluate the effects of a triazole grandisin analogue (TGA) in inflammatory biomarkers and object recognition memory in mice under intracerebroventricular  $A\beta_{1-42}$  injection.

**Experimental Approach:** Male C57/Bl6 mice underwent stereotaxic surgery, receiving intracerebroventricular injections of  $A\beta$  or vehicle. Intraperitoneal treatment with TGA (1 mg/kg) or vehicle was repeated for 14 days. One day after the end of treatment, novel object recognition task (NORT) was performed for memory improvement or deficit evaluation. Another set of animals had memantine (10 mg/kg) administered as a positive control for 14 days after  $A\beta$  injection, with NORT performed on days 7 and 14 of treatment. At the end of the task animals were euthanized and their cortex and hippocampus underwent oxidative stress and inflammatory biomarkers measurement.

**Key Results:** TGA reduced cortex/hippocampus lipoperoxidation in  $A\beta_{1-42}$  mice, prevented  $A\beta_{1-42}$  cognitive impairment as well as reducing tumor necrosis factor (TNF) and interferon (INF) levels without impacting control group after 14 days of treatment. Memantine failed to prevent lipid oxidation, recognition memory decline and to reduce TNF-INF concentrations.

**Conclusion and Implications:** Such results show that TGA was able to prevent memory impairment due to  $A\beta$  injection by antioxidant and anti-inflammatory effects. Moreover, the experimental drug could induce persistent neuroprotective effects, especially compared to memantine, reflecting its innovative properties.

**Keywords:** Alzheimer's Disease, neolignans, neuroprotecti on, oxidative stress.

## 6.1 Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a chronic neurodegenerative disease, affecting cognitive functions, such as speaking, learning and memory formation, along with autonomic alterations and motor disability. Demographically it is ubiquitous, estimated to be present in 4.4% of Europeans above 65 years-old and 9.7% for United States individuals above 70 years-old (Qiu *et al.*, 2009). Estimations for 2050 are that 23.5% of the males and 30.5% of the females aged above 85 years old will develop AD, resulting up to 152.8 million individuals affected by the disease (Nichols *et al.*, 2022).

Amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) plaques and Tau protein tangles are hallmarks of AD. Such proteins start to deposit in the prefrontal cortex and spreads through the hippocampus, which are crucial structures for memory and cognitive functions (Tiwari *et al.*, 2019).

$A\beta$  is generated by cleavage of APP (amyloid precursor protein) by  $\alpha$  and  $\beta$ -secretases, leading to nonamyloidogenic and amyloidogenic pathways, respectively. In the amyloidogenic pathway, APP is metabolized by  $\beta$ -secretases and  $\gamma$ -secretases, resulting in the production of amyloid beta protein ( $A\beta$ ). Physiologically,  $A\beta$  is able to sustain intermediate glutamate levels in synaptic cleft. Synaptic NMDA glutamate receptors (S-NMDA) activates calcium influx, inducing plasticity processes, such as neurogenesis and dendritic formation, which are necessary to memory formation. The balance in  $A\beta$  content is maintained by apolipoprotein E activity, which removes it from the synapses (Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, 2013). However, during AD progression,  $A\beta$  accumulates outside neurons on account of overproduction or decreased removal, yielding large and insoluble plaques or highly soluble oligomers (Canevari *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2020).

Under such conditions,  $A\beta$  oligomers increases glutamate release from neurons and also inhibits its reuptake on astrocytes. The excess of glutamate diffuses to spine neck, where extra-synaptic NMDA receptors (E-NMDA) are located. Activation of such receptors triggers calcium mediated tau hyperphosphorylation, oxidative damage by reactive oxygen and nitrogen species. Additionally,  $A\beta$  stimulates microglial cells to produce pro-inflammatory cytokines, such as TNF, IL-1 $\beta$  and INF; such inflammatory and oxidative environment leads to lipid peroxidation, protein carbonylation, neurogenesis impairment and dendritic spine loss (Marcus *et al.*, 1998; Centonze *et al.*, 2009; Lai *et al.*, 2017). Microglial cells can also lead to cell damage by myeloperoxidase (MPO) pathway. MPO is an enzyme present in granulocytes but also in microglia, being considered an infiltration marker. On the other hand, its activity engages hypochlorous acid production, which is highly oxidant (Aratani, 2018). Additionally, MPO activity is enhanced 21 days after  $A\beta$  i.c.v. injection in mice (Cazarin *et al.*, 2021). Therefore, oxidative and inflammatory events are hallmarks of neurodegeneration process in

AD.

Until the present day, there are quite a few pharmacological strategies to treat AD. Memantine is a non-competitive NMDA receptors antagonist, clinically used in AD treatment, lowering the pathologically high receptor activity (Matsunaga *et al.*, 2015). Nevertheless, such compound fails to prevent persistent neuronal damage in animals that received intracerebroventricular injections of A $\beta$  oligomers (Figueiredo *et al.*, 2013). Corroborating this result, it was demonstrated that clinical effects of memantine may decrease along disease progression, being slightly beneficial at mild-to-severe AD and no effect on mild AD (Reisberg *et al.*, 2003; Schmitt *et al.*, 2006; McShane *et al.*, 2019). Apart from it, acetylcholinesterase inhibitors are approved for AD in order to counteract loss of acetylcholine neurons (Food and Drug Administration; FDA, 1997, 2000, 2004, 2010). However, such drugs present important side effects and, despite having 7 similar efficiency, they may provide only small improvements on more severe cases of the disease (Birks, 2006; Js *et al.*, 2015; Birks & Harvey, 2018) and none of them is able to stop progressive neuron damage (H. Ferreira-Vieira *et al.*, 2016).

Based on the aforementioned, it is urgent to develop more effective pharmacological tools to treat AD. Therefore, natural products may be a source of new drugs, since several compounds found in plants show anti-inflammatory and antioxidant properties (Rondanelli *et al.*, 2018; Tao *et al.*, 2020; Nani *et al.*, 2021).

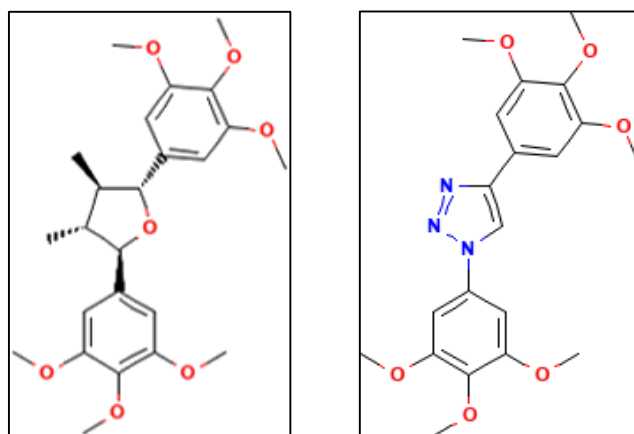
In this context, grandisin, a neolignan phytochemical compound obtained from the plant *Virola surinamensis*, commonly found in Amazon River banks, showed anti-inflammatory and antioxidant properties. Carvalho and colleagues (2010) showed that grandisin reduced inflammatory process in formalin induced paw edema and also in croton-oil induced ear edema (Carvalho *et al.*, 2010). Furthermore, Valadares and co-workers (2011) demonstrated that grandisin metabolite, 4-O-methylgrandisin, was able to scavenge free radicals in an electrochemical cell-based apparatus, suggesting antioxidant effects (Valadares *et al.*, 2011). Additionally, it was demonstrated that tetrahydrofuran neolignans increased neuronal survival in hippocampal neurons against A $\beta$  application, suggesting possible neuroprotective and neurogenic effects (Zhai *et al.*, 2005).

More recently, a triazole grandisin analogue (TGA) was synthesized by bioisosterism, by which its tetrahydrofuran core was replaced by a triazole ring. This new compound showed reduction of polymorphonuclear cells migration in carrageenan induced peritonitis, an effect that was absent in the original grandisin compound (Carvalho *et al.*, 2010).

Despite of its anti-inflammatory and antioxidant properties, nor grandisin or TGA have been tested in animal models of chronic inflammation. Considering that AD shows well established inflammatory and oxidative pathophysiological mechanisms, it is reasonable to assume that grandisin analogues may

counteract disease progression. In addition, unpublished data shows that TGA has  $c\text{LogP} = 2.49$  and fits other Lipinski's Rule of Five (Ro5)(Lipinski *et al.*, 2001) parameters for prediction of lead-like drugs, which is consistent to other compounds that are able to cross blood-brain barrier.

Therefore, the aim of the present work is to evaluate to evaluate the possible anti-inflammatory and antioxidant effects of TGA in an AD animal model.



**Figure 1.** Chemical structure of the tetrahydrofuran lignan grandisin (left side) and its bioisoster, triazole analogue grandisin (TGA), in the right side.

## 6.2 Bullet point summary:

- What is already known:
  - Oxidative stress and inflammation are crucial for cognitive impairment and tissue damage.
  - Triazole grandisin analogue (TGA) may reduce both factors but it needed evaluation.
- What this study adds:
  - TGA prevented cognitive impairment by amyloid oligomer 1-42.
  - TGA reduced tumor necrosis factor and interferon levels, while memantine did not.
- Clinical significance:
  - TGA showed more persistent effects than memantine, the reference drug.
  - This new drug may prove useful for Alzheimer's Disease treatment.
  -

## 6.3 Material and methods

### 6.3.1. Animals

Male C57/B16 mice, 7 to 9 weeks-old, were bred in pathogen-free conditions in Fundação Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – Campo Grande Animal Facility. They were kept in a temperature-controlled room, 25°C, with 12 hours dark-light cycle, with food and water *ad libitum*. The Ethics Committee in Animal Research of the Federal University of Mato Grosso do Sul approved the experimental design (protocol number: 1.129/2020).

### **6.3.2. Drugs and reagents**

The following drugs were used: ketamine; xylazine Sigma, St. Louis, Missouri, USA); amyloid-beta (A $\beta$  1-42; California Peptides); dimethylsulfoxide (DMSO, TOCRIS- USA); commercially available saline (0.9% NaCl); lysis buffer (20 mM sodium phosphate; pH 7.4, 0.1% Triton and 150 mM (1:20 w/v); memantine (MEM -commercially available). Triazol grandisin analogue (TGA) was obtained in the Laboratory of Pharmaceutical Chemistry of the Federal University of Mato Grosso do Sul, under the supervision of Dr. Adriano César de Morais Baroni. TGA was dissolved in Kolliphor – Sigma Chemical (10% in saline 0.9%).

### **6.3.3. A $\beta$ oligomer (A $\beta$ O) preparation**

A $\beta$  oligomer A $\beta$ 1-42 was solubilized in hexafluoroisopropanol, in order to obtain dry films of A $\beta$ 1-42 after solvent evaporation. Afterwards, this film was then dissolved in anhydrous and sterile DMSO (dimethyl sulfoxide) for a 5mM solution. This solution was then dissolved in PBS (phosphate-buffered saline) at 100  $\mu$ M concentration, incubated at 4°C for 16 hours.

This new solution was, then, centrifuged (14000 rpm/10 minutes/4°C) for protofibrils and insoluble fibrils removal; the supernatant solution, now, has soluble A $\beta$ O's, being stored at 4°C. Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) was performed in order to determine the final concentration of amyloid beta oligomers (A $\beta$ O's) in each tube. The concentration ranged from 79  $\mu$ M to 145  $\mu$ M. Preparation of ABO's was performed in the Laboratory of Biochemist, School of Medicine of Ribeirão Preto/SP, Brazil, under the supervision of Dr. Adriano Sebollela.

### **6.3.4. Intracerebroventricular injection**

Intracerebroventricular A $\beta$ O's injection was performed after mice intraperitoneal anesthesia with ketamine/xylazine (concentrations of 70mg.kg<sup>-1</sup>/10mg.kg<sup>-1</sup>, respectively), in a 10mg/mL volume.

Trichotomy was done after mice immobilization in a stereotaxic device (Stoelting, Wood Dale, IL,

USA). Lidocaine/vasoconstrictor (3% phenylephrine) solution was subcutaneously injected into the scalp in order to mitigate bleedings. Then, an approximately 0,5cm incision was done, keeping the periosteum away, exposing the cranial cavity. The region was then cleaned with hydrogen peroxide 10% and sodium chloride 0,9%.

As described by Diniz *et al* (Diniz *et al.*, 2017), a stainless steel guide cannula (0,9 mm diameter) was inserted in the mice left ventricle (coordinates as follow: anteroposterior = -0,3mm from lambda, lateral = 1,2mm, dorsoventral = -2,5mm). It was fixed to the skull using dental cement. An injection needle was used to administer the oligomer or vehicle in the left ventricle through a polyethylene catheter connected to a 10  $\mu$ L syringe (Hamilton, USA). A final volume of 2  $\mu$ L of the A $\beta$ O solution or its vehicle were applied through an infusion pump in 30 seconds (Clássico, Brazil).

### **6.3.5. Pharmacological treatment**

Mice were divided according to the intracerebroventricular (i.c.v.) or intraperitoneal (i.p.) treatment. ICV injections of A $\beta$ O or DMSO 10% determined the “condition group” and the “control group”, respectively. Ip injection of vehicle (0.9% saline/Kolliphor 10%, emulsifier used for the drug solubilization) TGA or MEM yielded the pharmacological treatment groups. Therefore, the resulting groups are: 1 (Control-i.c.v./Vehicle-i.p.), 2 (A $\beta$ O-i.c.v./Vehicle-i.p.), 3 (Control-i.c.v./TGA-i.p.), 4 (A $\beta$ O-i.c.v./TGA-i.p.). In another set of animals, Control-i.c.v./TGA-i.p. group was replaced by A $\beta$ O-i.c.v./MEM-i.p. group, in order to compare TGA effects with a positive control, such as memantine (MEM), which is a clinical drug for AD.

Twenty-four hours after stereotaxic surgery, IP treatment started and was repeated once per day for 14 days, with either vehicle, TGA (1 mg/Kg) or MEM 10 mg/Kg (Figueiredo *et al.*, 2013) at a final volume of 10 mL/kg. Solutions were prepared slightly before the treatment. Animals were daily weighed to check animal health. Each experimental group had 7-8 animals.

### **6.3.6. Novel object recognition test**

In order to assess both the impact of A $\beta$ O i.c.v. injection and the pharmacological treatment on mice cognition, Novel Object Recognition task (NORT) was used. In this model, each mouse is placed in a round arena with acrylic walls (40cm diameter, 40cm height) with a wooden floor divided in 16 quadrants.

After 14 days of pharmacological treatment, mice underwent a 5 minutes habituation session in the

arena. In this previous session, locomotor activity was assessed in the Open Field Test. 24 hours later, in the first test day (T1) mice were individually placed in the arena facing the posterior acrylic wall. They were allowed to explore two identical objects placed in symmetric positions (around 16 cm height, heavy enough not to be displaced) for 5 minutes. Twenty-four hours later T2 was performed by replacing one of the old objects for a new one (different from both T1 objects in size, texture and color), allowing again 5 minutes of exploration (Figure 2-b). Mouse turning its face towards an object close to a 2 cm distance while it glares, sniffs or touches the object characterizes object exploration.

In the second set of animals, where A $\beta$ O-i.c.v./MEM-i.p. group was used, NORT was performed twice. In the first NORT test, was performed after 7 days of pharmacological treatment, matching T2 with the 8<sup>th</sup> day after A $\beta$ , in order to evaluate early effects of both compounds. Additionally, in this first test, T2 was made before pharmacological treatment, to avoid any acute effect of the compounds. The second NORT test occurred after 14 days of treatment, aiming to evaluate possible protective effects of both compounds on persistent memory impairment. The objects used in the second NORT test were completely different from those used in the first test to avoid overlapping information.

The obtained values from T1 and T2 are used to calculate discrimination index (d2). This variable is obtained employing the formula  $d2 = T2 \text{ (novel object - familiar object)} / T2 \text{ (total object exploration time)}$ . Positive values indicate preference to the new object, while negative values show higher exploration of the familiar object. In the case of  $d2 = 0$  (zero), animals demonstrate no preferences whatsoever. Those results are a parameter used to assess recognition memory. A high d2 value (0.2-0.35) shows high cognitive performance in this task. On the other hand, values close to zero or even negative values indicate poor cognitive performance (Prickaerts *et al.*, 1997; Rutten *et al.*, 2008).

After the NOR test, mice were euthanized, decapitated and had their cortex and hippocampus dissected and stored at -80°C freezer for biological assays.

### **6.3.7. Oxidative stress assays**

#### **6.3.7.1. Lipoperoxidation evaluation**

As described by Parisotto and co-workers (Parisotto *et al.*, 2015), lipid oxidation was assessed through TBARS (thiobarbituric acid reactive species) levels, mostly malondialdehyde. The lysate solution was precipitated with 800  $\mu$ L of trichloroacetic acid (TCA) 12% (v/v) and then incubated with TBA 0.73% for 60 minutes, 100°C, in a 60 nM Tris-HCl + 0.1nM DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) buffer, pH 7,4. The solutions were then centrifuged for 5 minutes (1500 RCF). Absorbance was read at 535 nm in a spectrophotometer, in duplicates. The formula used was  $\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , values

in nmol/mL. The results were normalized by calculating the amount of protein in each sample.

#### **6.3.7.2. Myeloperoxidase assay**

A volume of 20  $\mu$ L from samples was transferred in tubes containing 150  $\mu$ L of a previous solution added (165  $\mu$ L of o-dianisidine hydrochloride, 50  $\mu$ L of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, distilled H<sub>2</sub>O and monosodium phosphate 50nM). It was incubated at room temperature for 15 minutes. In order to stop the reaction, 15  $\mu$ L of sodium azide 1% was then added, and again incubated for 10 minutes in room temperature. The results were read in an ELISA reader in the 450 nm wavelength. The results were compared to a standard curve. Myeloperoxidase activity is expressed as mU/mL (Parisotto *et al.*, 2015).

#### **6.3.7.3. Carbonyl protein assay**

In order to assess carbonyl protein concentrations, 100  $\mu$ L of the sample was added to 600  $\mu$ L of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) for derivatization, with later addition of ethanol/ethyl acetate (1:1, v/v) to remove DNPH. Afterwards, 600  $\mu$ L of guanidine chloride was added, with the carbonyl proteins being read at 370 nm (Levine *et al.*, 2000; Parisotto *et al.*, 2015). A standard curve was made using albumin in order to normalize the protein concentration (LOWRY *et al.*, 1951).

Protein carbonyls are produced on account of aldehydes and ketones formed during oxidative stress in physiological and mostly in pathological conditions. The hydrazine group of DNPH reacts with the carbonyl groups in the amino acid residues of proteins, resulting in a stable hydrazone, that is read at 370nm. Since 2,4-dinitrophenylhydrazine also has a significant absorbance at 370nm, the ethanol/ethyl acetate solution removes such excess of DNPH (Levine *et al.*, 2000).

#### **6.3.8. Cytokine Quantification**

The cytokines TNF, INF and IL-6 were quantified from mice Hpc samples by flow cytometry (CytoFLEX, Beckman Coulter, USA) using the mouse immunoglobulin Cytometric Bead Array (CBA, BD Biosciences) according to manufacturer's instructions. Flowjo V10.8 (BD) and GraphPad Prism v8.0 software were used for data analysis. Results were expressed as pg/mL, based on standard concentration curves.

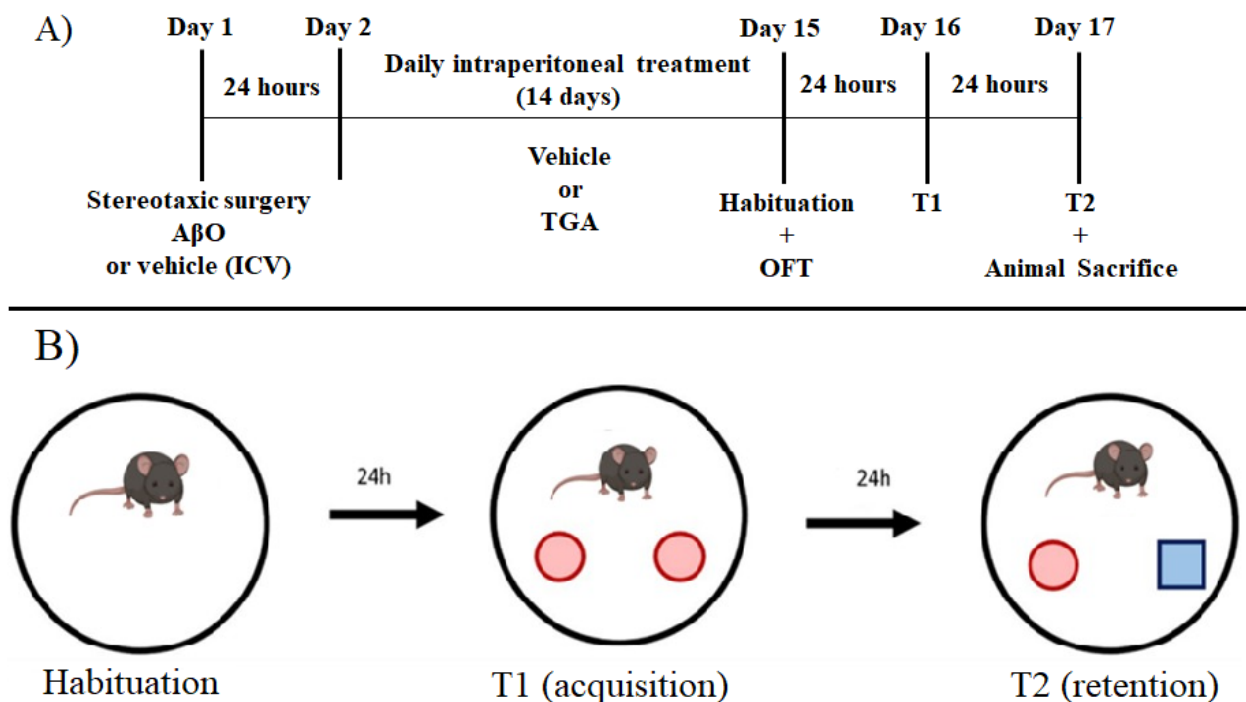


### 6.3.9. Experimental Protocol

Figure 2-A shows the timeline of the study protocol. Stereotaxic surgery was performed in the first day for ICV administration of vehicle or A $\beta$ O, followed by 14 days of intraperitoneal treatment with vehicle or TGA. 24 hours after the last day of treatment ORT was performed, avoiding the need of an additional experimental group with acute treatment. Animals were sacrificed after behavioral tests and Ctx and Hpc were harvested for molecular analysis.

### 6.3.10. Statistical analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  SEM and were analyzed using one-way ANOVA. The Bonferroni post-test was used to reveal specific differences among experimental groups and the control group. A significance level of  $p < 0.05$  was considered.

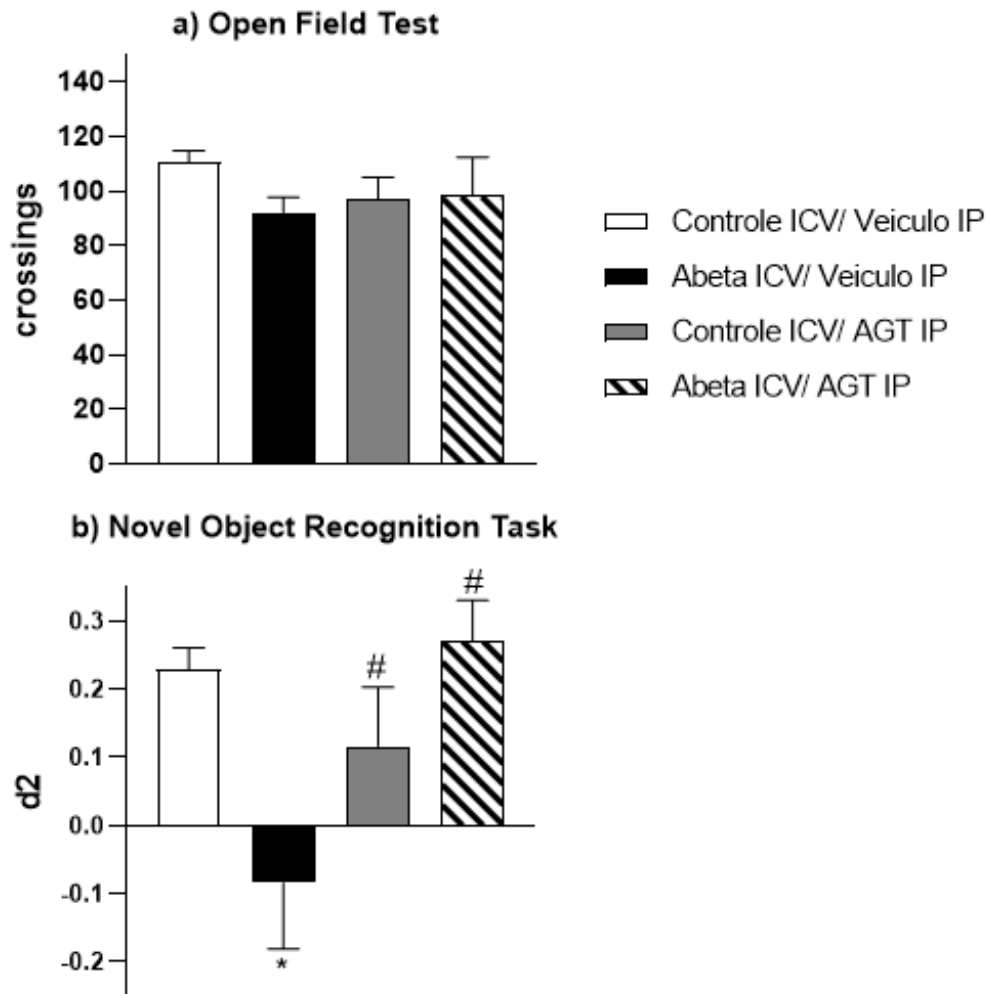


**Figure 2.** (a) Simplified experimental timeline. On day 1 mice were submitted to stereotaxic surgery for A $\beta$ O or vehicle (DMSO 10%) ICV injection. On day 2, intraperitoneal treatment with vehicle (Kolliphor 10%; saline 0.9%) or TGA begins, lasting for 14 days. On the last day of treatment (day 15), habituation session and Open Field Test (OFT) are carried out before injections. Novel Object Recognition Task T1 (acquisition session) and T2 (retention session) are performed in a 24 hours interval in the last two days of the protocol. Immediately after T2, animals are sacrificed for tissue collection. (b) Novel Object Recognition Task: in the first day, animals are allowed to explore the arena for 5 minutes (habituation session). One day later, they are placed in the same arena with two identical objects located in symmetric positions (T1-acquisition). 24 hours later, one of the old objects is replaced for a new one and exploration time is again recorded (T2-retention).

## 6.4. Results

### 6.4.1. Effects of repeated treatment with TGA on cognitive performance in A $\beta$ O injected mice on NORT

Recognition memory of mice was evaluated after daily intraperitoneal treatment for 14 days with TGA or vehicle on control or A $\beta$ O mice. A $\beta$ O-ICV/vehicle-IP animals showed significantly reduction on d2 index in comparison with Control-ICV/Vehicle-IP group ( $0.22 \pm 0.03$  vs  $-0.08 \pm 0.09$ ;  $P < 0.01$ ,  $F_{(3,28)} = 4.69$ ). It demonstrates the characteristic cognitive decline induced by ICV A $\beta$ O injection. Control mice treated with TGA showed no difference on d2 when compared with Control-ICV/Vehicle-IP ( $0.22 \pm 0.03$  vs  $0.12 \pm 0.09$ ;  $P > 0.05$ ). On the other hand, TGA treatment prevents memory impairment induced by ABO injection, since there was no difference between Control-ICV/Vehicle-IP and A $\beta$ O-ICV/vehicle-IP groups ( $0.22 \pm 0.03$  vs  $0.27 \pm 0.06$ ;  $P > 0.05$ ) (Figure 3-b). Results of OFT showed that locomotor activity was not modified by any experimental conditions (data not shown), reinforcing that the reduction in d2 observed in A $\beta$ O-ICV/vehicle-IP was due to memory deficit and not by locomotor impairment.



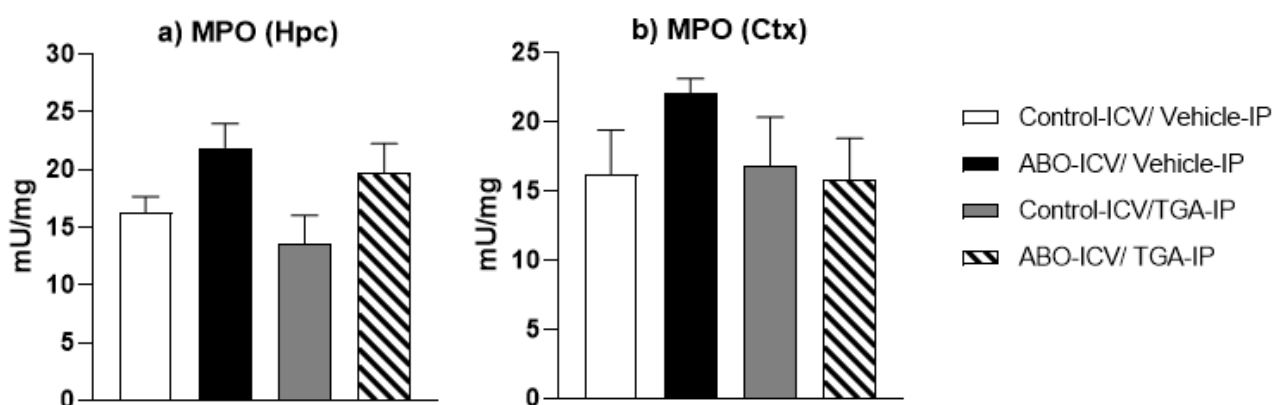
**Figure 3.** (a) Locomotor activity of mice of each experimental group expressed as number of subsection crossings performed in the Open Field Test. (b) Discrimination index (d2) evaluated in the Novel Object Recognition Task. ABO-ICV/Vehicle-IP shows memory impairment when compared to the Control-ICV/Vehicle-IP (\* $P < 0.05$ ). TGA shows no effect per se in control animals, but prevented cognitive disruption in A $\beta$ O mice (#non-significantly different from Control-ICV/Vehicle-IP). Values are Mean  $\pm$  SEM.

#### 6.4.2. Effects of repeated treatment with TGA on myeloperoxidase activity, lipoperoxidation and protein carbonylation in cortex and hippocampus of A $\beta$ O injected mice

In order to evaluate possible beneficial antioxidant effects of TGA in A $\beta$ O mice, we sought to investigate the activity of the pro-oxidant enzyme, myeloperoxidase, and also the level of brain oxidative damage markers, such as lipid peroxidation and protein carbonyls. Table 1 depicts the results of variance analysis of each variable measured.

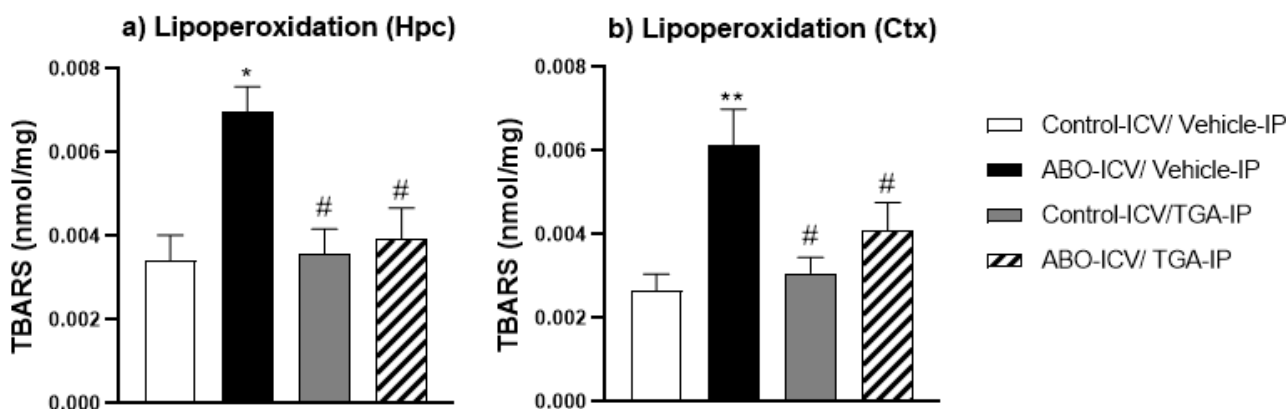
Myeloperoxidase activity was found to be slightly higher in both Hpc and Ctx in A $\beta$ O mice treated with vehicle when compared to the control group. Nevertheless, such difference was not significant

(Hpc:  $P=0.18$ ,  $F_{(2,38)}=2.08$ ; Ctx:  $P=0.66$ ,  $F_{(2,38)}=0.55$ ; Figure 4-a,b; Table 1). Therefore, oxidative damage induced by A $\beta$ O might not involve myeloperoxidase pathway.



**Figure 4.** Myeloperoxidase activity (MPO-mU/mg) expressed as mean  $\pm$  SEM in Hpc (a) and Ctx (b) of A $\beta$ O and control mice treated with vehicle of TGA. A $\beta$ O does not enhance MPO activity in both brain areas 14 days after ICV injection. One-way ANOVA corrected with Bonferroni post-hoc test shows no significant difference among experimental groups.

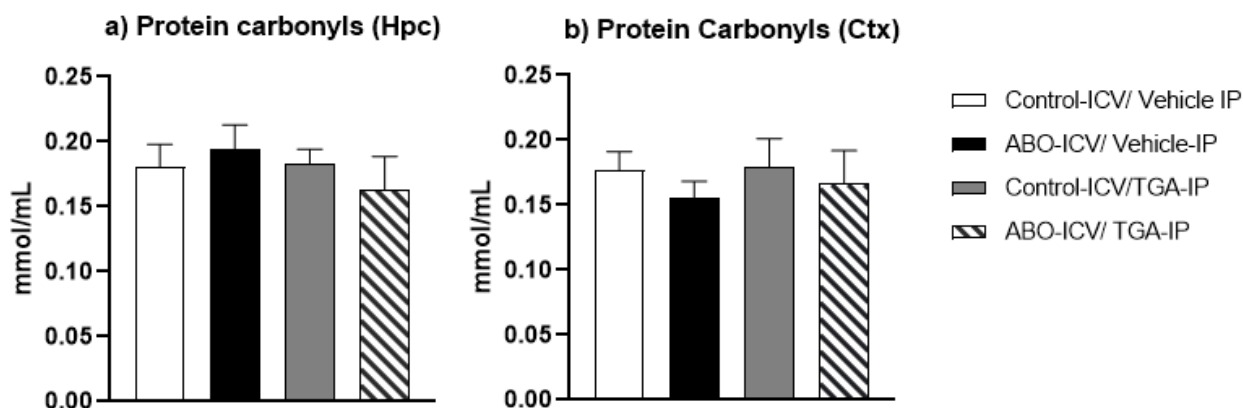
On the other hand, lipid peroxidation (TBARS) was significantly higher in vehicle treated A $\beta$ O mice in comparison with the control group in both Hpc and Ctx. Such results demonstrate the pro-oxidant effect of A $\beta$ O on both structures. Repeated treatment with TGA had no effect on lipoperoxidation in control mice. However, TGA was capable of preventing lipid oxidative damage on both structures (Hpc:  $P<0.05$ ,  $F_{(2,38)}=6.80$ ; Ctx:  $P<0.01$ ,  $F_{(2,38)}=6.65$ ; Figure 5-a,b; Table 1).



**Figure 5.** Lipid peroxidation (TBARS-nmol/mg) expressed as mean  $\pm$  SEM in Hpc (a) and Ctx (b) of A $\beta$ O and control mice treated with vehicle of TGA. A $\beta$ O enhance TBARS levels in both brain areas 14 days after ICV injection when compared to Control-ICV/Vehicle-IP (\* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ). TGA shows no effect per se in control animals, but prevented cognitive disruption in A $\beta$ O mice (#non-significantly different from Control-ICV/Vehicle-IP).

Moreover, protein carbonyls content was also measured as an additional oxidative damage marker. Our results show that A $\beta$ O did not modify protein carbonyls levels in both hippocampus and cortex in

comparison with the control group, demonstrating that such parameter may not be altered 14 days after ICV injection (Hpc:  $P=0.72$ ,  $F_{(2,38)}=0.45$ ; Ctx:  $P=0.82$ ,  $F_{(2,38)}=0.31$ ; Figure 5-a,b, Table 1).



**Figure 6.** Protein carbonyls levels (mmol/mL) expressed as mean  $\pm$  SEM in Hpc (a) and Ctx (b) of A $\beta$ O and control mice treated with vehicle of TGA. A $\beta$ O was unable to enhance protein carbonyl content in both brain areas 14 days after ICV injection when compared to Control-ICV/Vehicle-IP.

**Table 1:** Mean values of pro-oxidant enzymatic activity and neuronal oxidative damage markers in hippocampus and cortex among experimental groups

| Group                         | Hippocampus            |  |                       | Cortex                 |   |                       |
|-------------------------------|------------------------|--|-----------------------|------------------------|---|-----------------------|
|                               | MPO (mU/mg)            | TBARS level (nmol/mg)                    | PC level (mmol/mL)    | MPO (mU/mg)            | TBARS level (nmol/mg)                     | PC level (mmol/mL)    |
| Control-ICV<br>Vehicle-IP     | 16.32 $\pm$ 1.38       | 0.0034 $\pm$ 0.0006                      | 0.18 $\pm$ 0.02       | 16.22 $\pm$ 3.17       | 0.0027 $\pm$ 0.0004                       | 0.18 $\pm$ 0.01       |
| A $\beta$ O-ICV<br>Vehicle-IP | 21.89 $\pm$ 2.07<br>ns | 0.0069 $\pm$ 0.0010*<br><b>P&lt;0.05</b> | 0.19 $\pm$ 0.02<br>ns | 22.04 $\pm$ 1.05<br>ns | 0.0061 $\pm$ 0.0008**<br><b>P&lt;0.01</b> | 0.16 $\pm$ 0.01<br>ns |
| Control-ICV<br>TGA-IP         | 13.61 $\pm$ 2.39<br>ns | 0.0036 $\pm$ 0.0006<br>ns                | 0.18 $\pm$ 0.01<br>ns | 16.76 $\pm$ 3.56<br>ns | 0.0031 $\pm$ 0.0004<br>ns                 | 0.18 $\pm$ 0.03<br>ns |
| A $\beta$ O-ICV<br>TGA-IP     | 19.72 $\pm$ 2.51<br>ns | 0.0039 $\pm$ 0.0007<br>ns                | 0.16 $\pm$ 0.03<br>ns | 15.84 $\pm$ 2.93<br>ns | 0.0034 $\pm$ 0.0007<br>ns                 | 0.17 $\pm$ 0.03<br>ns |

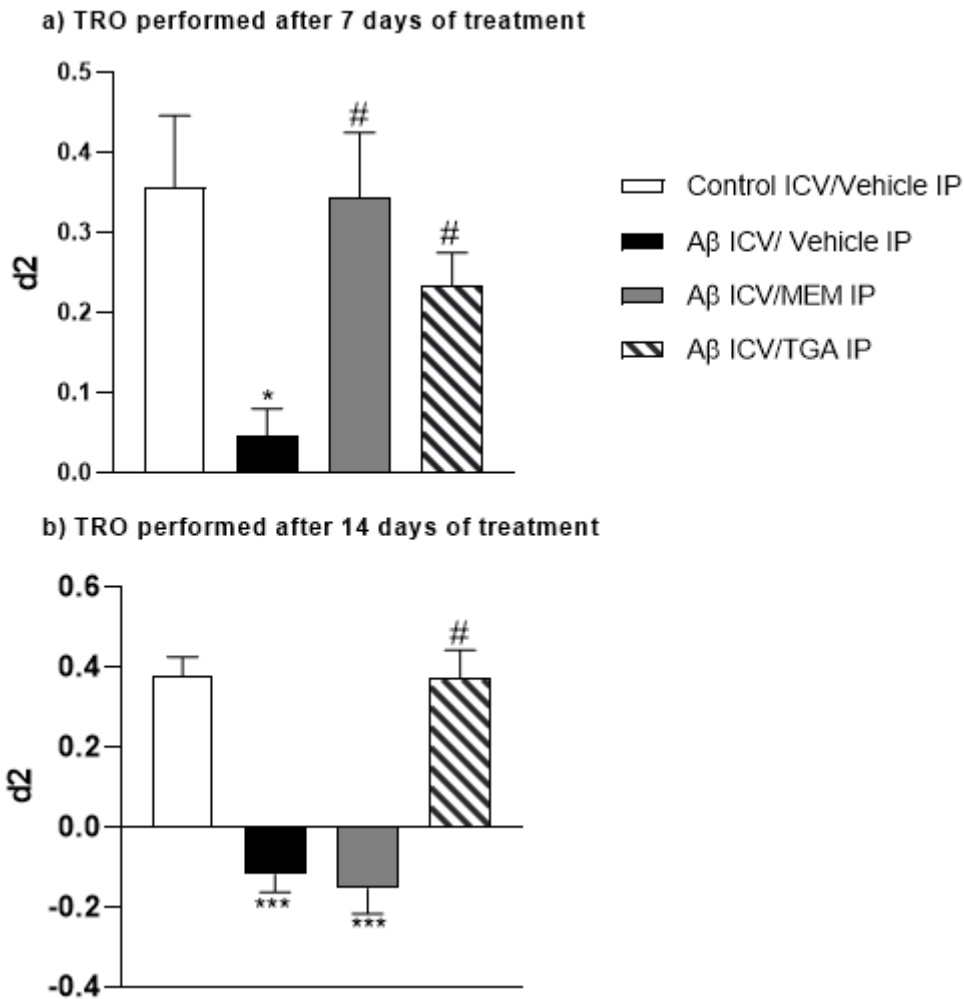
Values are Mean  $\pm$ SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01 are considered significantly different from the Control-ICV/Vehicle-IP group and are depicted in bold. ns: non-significant (P>0.05). MPO: myeloperoxidase; TBARS: thiobarbituric acid; PC: protein carbonyls.

### **6.4.3. Effects of TGA or MEM on cognitive performance in A $\beta$ O injected mice on NORT after 7 and 14 days of repeated treatment**

In order to evaluate the effects of TGA on transient or persistent cognitive impairment, NORT was performed after 7 and 14 days of treatment. Since MEM is unable to prevent persistent memory impairment (Figueiredo *et al.*, 2013), in this new protocol the group Control ICV/TGA IP was replaced by A $\beta$  ICV./MEM IP, as a positive control.

After 7 days of treatment, there is a sharp decrease in d2 index in A $\beta$ <sub>42</sub> i.c.v./vehicle i.p. group in comparison to Control i.c.v./vehicle i.p. ( $0.35 \pm 0.09$  vs  $0.04 \pm 0.03$ ;  $p < 0.05$ ,  $F_{(3,25)} = 3.65$ ). Memantine managed to prevent memory impairment after 7<sup>th</sup> day of treatment ( $0.35 \pm 0.09$  vs  $0.34 \pm 0.08$ ;  $p > 0.05$ ). Likewise, TGA also prevented recognition memory impairment ( $0.35 \pm 0.09$  vs  $0.23 \pm 0.04$ ;  $p > 0.05$ ) (Figure 7-a).

After 14 days of treatment, expected persistent A $\beta$ <sub>42</sub> induced memory impairment was observed ( $0.37 \pm 0.05$  vs  $-0.12 \pm 0.04$ ;  $p < 0.001$ ,  $F_{(2,35)} = 27.09$ ). However, MEM failed to prevent the reduction in d2 index ( $0.37 \pm 0.05$  vs  $-0.15 \pm 0.06$ ;  $p < 0.001$ ). On the other hand, TGA was able to prevent recognition memory deficit induced by A $\beta$ <sub>42</sub> injection ( $0.37 \pm 0.05$  vs  $0.37 \pm 0.07$ ;  $p > 0.05$ ) (Figure 7-b).



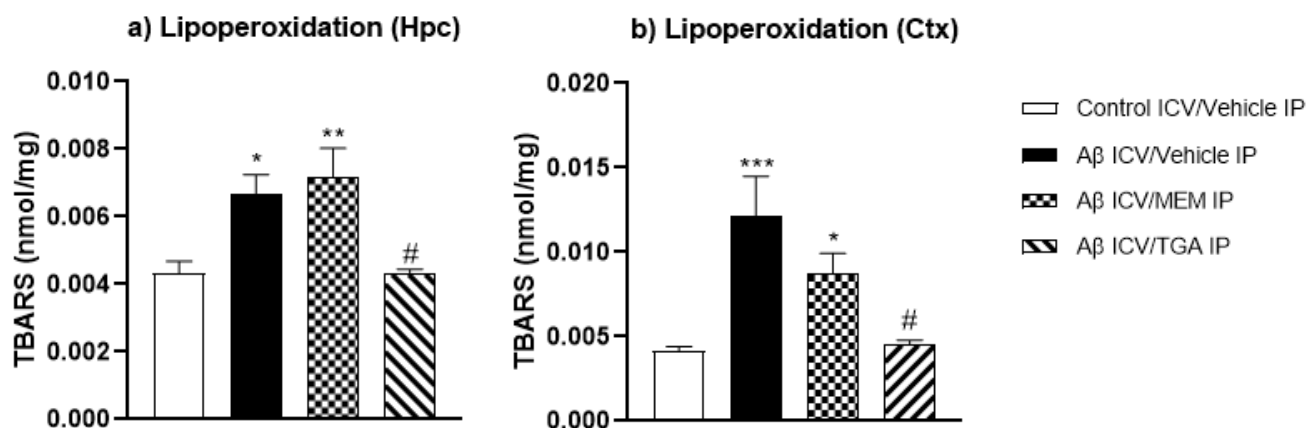
**Figure 7.** Discrimination index (d2) evaluated in the Novel Object Recognition Task. **(a)**After 7 days of treatment, A $\beta_{42}$  i.c.v./Vehicle i.p. shows memory impairment in comparison to Control i.c.v./Vehicle i.p. Both MEM and TGA prevented memory deficit induced by A $\beta_{42}$  ICV injection. **(b)**After 14 days of treatment, MEM failed to prevent persistent memory impairment, while TGA was still able to prevent A $\beta_{42}$  induced memory deficit (\*P<0.05; \*\*\*P<0.001; #non-significantly different from Control-ICV/Vehicle-IP).

#### 6.4.4. Effects of repeated treatment with TGA or MEM on lipoperoxidation in cortex and hippocampus of A $\beta$ O injected mice

Since lipoperoxidation rising induced by  $\beta A_{42}$  injection was prevented by TGA treatment (Figure 5), such marker was used to compare our experimental compound with MEM on oxidative status. As expected, A $\beta_{42}$  led to pro-oxidative effects in Hpc ( $0.004 \pm 0.0004$  vs  $0.007 \pm 0.0006$ ; \*p<0.05; ;  $F_{(3,26)} = 7.90$ ). After 14 days of treatment, MEM was unable to prevent lipoperoxidation ( $0.004 \pm 0.0004$  vs  $0.007 \pm 0.0009$ ; \*\*p<0.01). As expected, TGA precluded TBARS increasing in this brain area ( $0.004 \pm 0.0004$  vs  $0.004 \pm 0.0001$ ; p>0.05) (Figure 8-a).

In cortex, A $\beta_{42}$  oligomer once again increased oxidative damage in comparison to Control ICV./Vehicle IP ( $0.004 \pm 0.0003$  vs  $0.012 \pm 0.002$ ; \*\*\*p<0.001;  $F_{(3,26)} = 9.84$ ). MEM was not able to prevent lipoperoxidation

( $0.004 \pm 0.0003$  vs  $0.009 \pm 0.001$ ;  $*p < 0.05$ ), while TGA effectively prevented TBARS enhancement ( $0.004 \pm 0.0003$  vs  $0.004 \pm 0.0003$ ) (Figure 8-b).



**Figure 8.** Lipid peroxidation (TBARS-nmol/mg) expressed as mean  $\pm$  SEM in hippocampus (a) and cortex (b) of A $\beta$ O and control mice treated with vehicle, MEM or TGA. A $\beta$ O promoted lipid peroxidation in both areas when compared to Control i.c.v./vehicle i.p. ( $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ ). TGA prevented lipoperoxidation, however MEM failed to show any antioxidant effects ( $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ ; #non-significantly different from control i.c.v./vehicle i.p.).

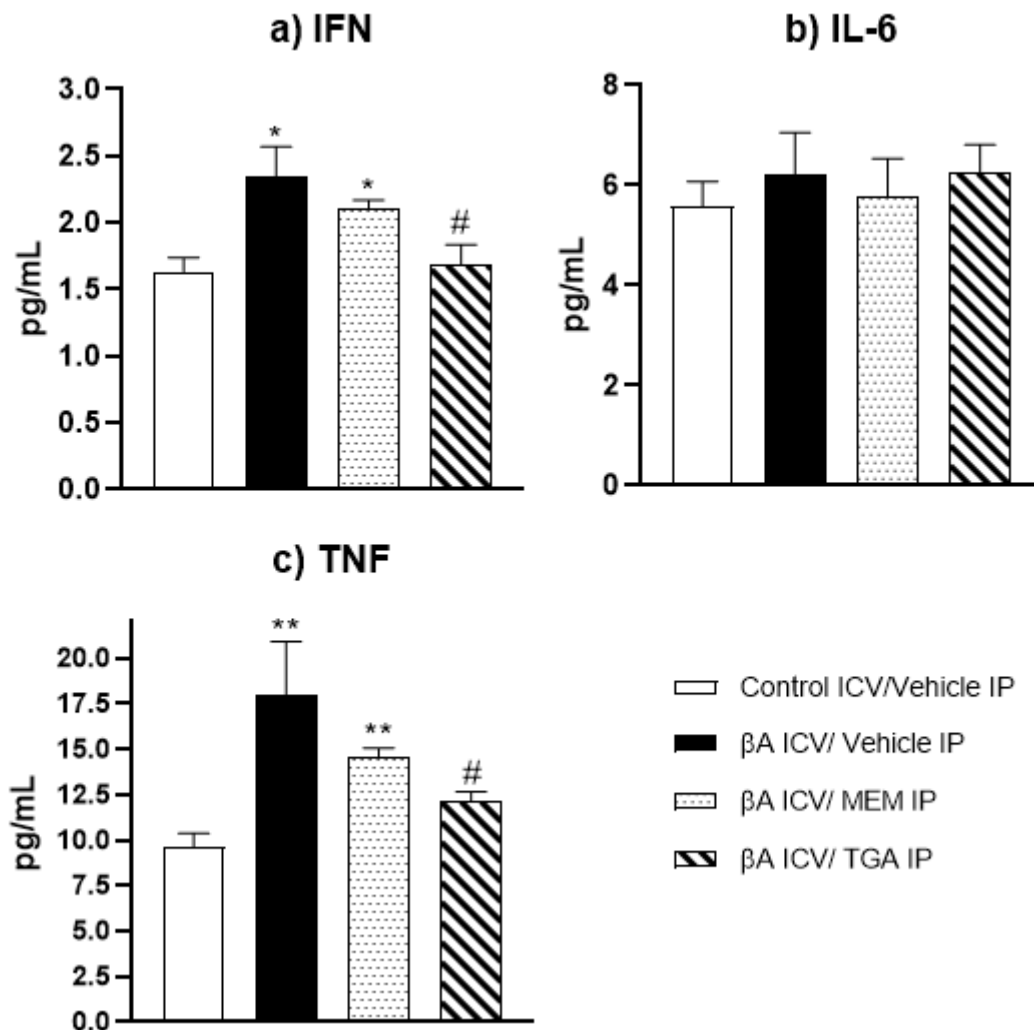
#### 6.4.5. Effects of repeated treatment with TGA or MEM on cytokines levels in hippocampus of A $\beta$ O injected mice

Through the Cytometric Bed Array (CBA), we estimated the concentration of interferon gamma (IFN) and the pro-inflammatory cytokines Tumor Necrosis Factor (TNF) and interleukin-6 (IL-6) in the Hpc of mice. A $\beta_{42}$  effectively increased IFN levels ( $1.63 \pm 0.11$  vs  $2.35 \pm 0.22$ ;  $*p < 0.05$ ,  $F = 8.78$ ). While MEM failed to inhibit its enhancement ( $1.63 \pm 0.11$  vs  $2.10 \pm 0.07$ ;  $*p < 0.05$ ), TGA managed to maintain it in control control levels ( $1.63 \pm 0.11$  vs  $1.82 \pm 0.14$ ;  $p > 0.05$ ) (Figure 8-a).

Regarding IL-6, A $\beta_{42}$  was unable to modify its concentration in Hpc when compared to the control group ( $5.59 \pm 0.20$  vs  $6.67 \pm 0.61$ ;  $p > 0.05$ ,  $F_{(4,24)} = 5.31$ ). The IL-6 levels were not significantly changed in the MEM ( $5.59 \pm 0.20$  vs  $5.56 \pm 0.27$ ;  $p > 0.05$ ) nor in TGA groups ( $5.59 \pm 0.20$  vs  $6.27 \pm 0.22$ ;  $p > 0.05$ ) (Figure 8-b).

In the TNF group, A $\beta_{42}$  promoted an increase in its concentration in Hpc ( $9.64 \pm 0.73$  vs  $17.97 \pm 2.93$ ;  $**p < 0.01$ ;  $F_{(4,24)} = 5.00$ ). MEM was unable to prevent TNF levels enhancement ( $9.64 \pm 0.73$  vs  $13.51 \pm 0.32$ ;  $**p < 0.01$ ). On the other hand, TGA did inhibit its increasing in this brain structure ( $9.64 \pm 0.73$  vs  $12.16 \pm 0.50$ ;  $p > 0.05$ ).





**Figure 9.** Pro-inflammatory cytokines concentrations in Hpc of mice, expressed as mean  $\pm$  SEM (pg/mL). **(a)** IFN levels were significantly increased by  $A\beta_{42}$  injection when compared to control group. MEM failed to inhibit its enhancement, while TGA was capable of preventing its increase (#non-significantly different from Control ICV/Vehicle IP). **(b)**  $A\beta_{42}$  was unable to increase IL-6, when compared to control levels ( $p > 0.05$ ). Such difference was also absent in  $\beta$ A ICV/MEM IP and  $\beta$ A ICV/TGA IP groups. **(c)**  $A\beta_{42}$  enhanced TNF levels in Hpc. MEM could not prevent TNF rising induced by  $A\beta_{42}$ , while TGA treated animals had TNF levels comparable to control group (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; #non-significantly different from Control ICV./Vehicle IP).

## 6.5. Discussion

Our results demonstrate that the intracerebroventricular (ICV) injection of A $\beta$  oligomers was able to induce memory loss in mice (Figure 3-b), corroborating other studies that also obtained similar results in NORT (Chen L. *et al.*, 2017; Lourenco *et al.*, 2019). This analysis is very important, since the evaluation of memory proposed in NORT triggers brain regions involved in memory formation, such as Ctx and Hpc, both affected in AD. Since locomotor activity evaluated in OFT was not affected by any conditions (Figure 3-a), lack of object exploration may be attributed to memory impairment. In addition, the repeated treatment with TGA had no effect on control mice. However, the compound was able to prevent discrimination index (d2) impairment in mice that received A $\beta$ -ICV in NORT after 14 days of repeated treatment (Figure 3-b). This ability may be associated with the antioxidant and anti-inflammatory properties of the compound (Carvalho *et al.*, 2010; Valadares *et al.*, 2011). Such properties are promising, since in AD there is activation of E-NMDA receptors, which stimulate the production and release of reactive species, such as nitric oxide (NO) and superoxide anion (O $_2^-$ ) and also activation of inflammatory response and cytokines, that lead to neuronal death and cognitive loss (Talantova *et al.*, 2013).

In this context, animals that received A $\beta$ -ICV showed increased levels of TBARS, a marker of lipid peroxidation, in both Ctx and Hpc, evidencing A $\beta$  pro-oxidative effects (Figure 5). We also observed a marked reduction in lipid oxidative damage via TBARS in mice that underwent TGA treatment. This effect may be associated with grandisin ability to scavenge free radicals (Valadares *et al.*, 2011), which may lead to a reduction in lipid peroxidation in both areas.

However, A $\beta$  was not able to alter myeloperoxidase (MPO) activity and protein carbonyls (PC) after 14 days (Figure 4; Figure 6). Studies that used an animal model like ours obtained an increase in MPO levels in the twenty-first day after A $\beta$  administration (Mosunmola *et al.*, 2022). Therefore, it is possible that MPO increased activity needs a longer period after A $\beta$  injection to be detected. Regarding PC, it was observed that its enhancement in both Ctx and Hpc lasts for 10 days after A $\beta$  injection. However, PC return to control levels after the 10<sup>th</sup> day (Jin Hyeong Jhoo *et al.* 2004). Thus, we believe that we did not observe an increase in PC formation as our analyzes were performed after 14 days of A $\beta$  injection.

Besides oxidative stress, inflammation is also present in AD, since A $\beta$  oligomers stimulate the release of TNF, INF and IL-6 in in vitro and in vivo AD models (Floden *et al.*, 2005; Bedse *et al.*, 2014). In addition to this, microglia is also stimulated to produce pro-inflammatory cytokines and other

mediators that make a neurotoxic environment and favor the progression of the disease (Floden *et al.*, 2005). In our study, we observed increased TNF and INF production in Hpc, after 16 days of A $\beta$  ICV injection. Since neolignans, such as TGA, have anti-inflammatory effects (Carvalho *et al.*, 2010), we seek to evaluate the levels of these cytokines in Hpc after repeated pharmacological treatment. The results show that TGA prevented TNF and INF enhancement induced by A $\beta$  (Figure 9). Such anti-inflammatory effect could be a result of lower microglial activation, since these are the primary immune cells of the brain. However, some effect of these compounds on astrocytes function is also possible. Apart from its role on regulation of glutamate levels in synaptic cleft, astrocytes can also release TNF and INF and contribute to neuronal damage stimulated by A $\beta$  (Benito *et al.*, 2012). A possible pharmacological target for TGA in these cells is NF- $\kappa$ B pathway, which is a transcription factor for pro-inflammatory cytokines that can be triggered by A $\beta$  (Thawkar & Kaur, 2019). Other neolignans, such as arctigenin and fargesin display anti-inflammatory properties by inhibiting this pathway (Xu *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2021). Since, TGA belongs to this same class, it is possible that this experimental molecule may preclude NF- $\kappa$ B activation in microglia and astrocytes induced by A $\beta$  in Hpc. It is important to mention, that the lack of IL-6 increase can be due to the AD model used. Khodadadi and colleagues (2021) observed increased IL-6 in a transgenic AD model in 3-months-old mice (Khodadadi *et al.*, 2021). Such result suggest that IL-6 may need a more chronic A $\beta$  deposition to be altered.

Interestingly, in 2013, Figueiredo and collaborators reported that low molecular weight A $\beta$  oligomers (LMW) induce persistent neuronal damage, demonstrated by memory impairment on 14<sup>th</sup> day after ICV injection. On the other hand, high molecular weight oligomers (HMW) led to transient memory impairment that was only observed on the 7<sup>th</sup> day after A $\beta$  administration. In addition, the same authors showed that MEM was able to rescue the transient cognitive impairment caused by HMW oligomers but failed to prevent memory impairment induced by LMW. These data indicate that MEM is not capable of counteracting the persistent neural damage, which is consistent with the loss of clinical efficacy as the disease progresses (Reisberg *et al.*, 2003). Consistently with these previous data, our results show that MEM is able to prevent acute memory impairment, but not persistent memory loss after 14 days of treatment (Figure 7-a,b). On the other hand, TGA demonstrated to have not only acute effects, but also led to prolonged preventive effect on memory when compared to MEM (Figure 7-a,b). The behavioral data is corroborated by the molecular experiments, since MEM, but not TGA, fails to prevent TBARS, TNF and IFN enhancement after 14 days of treatment (Figure 8; Figure 9), showing persistent antioxidant and anti-inflammatory effects. Therefore, it is relevant to argue that TGA prevents cognitive impairment caused by both HMW and LMW oligomers. Consequently, although we do not know for sure the mode of action of TGA, this compound has a potentially innovative effect

in this AD model compared to a clinical drug.

It is interesting to note that the treatment with TGA was interrupted about 48 hours before T2 of NORT. Because of this, it is likely that the concentration of TGA in the CNS was considerably reduced during the test. Even so, TBARS, TNF and IFN, as well as the cognitive activity were still at control levels (Figure 8, Figure 9). Therefore, the effect of TGA on oxidative stress, inflammation and cognitive function is persistent and perhaps the compound may induce more profound neuroprotective effects. In fact, a study performed by Zhai and collaborators in 2005, demonstrated that tetrahydrofuran neolignans were able to favor the viability of hippocampal neurons treated with A $\beta$  oligomers. In the same work, it was also highlighted that the application of these molecules increased the amount of neurites in cultured cortical neurons (Zhai *et al.*, 2005), suggesting that TGA structure related compounds have a neurotrophic effect. Thus, the prevention of cognitive impairment, as well as the reduction in lipid peroxidation and inflammatory mediators observed in our study, may be due to possible neuroplastic effects induced by repeated treatment with TGA. However, these possible effects need yet to be addressed.

Based on such results, we can conclude that systemically TGA repeated treatment prevents memory decline in animals that received A $\beta$  ICV injection, showing antioxidant and anti-inflammatory effects on Ctx and Hpc. In addition, TGA effects on memory are persistent, demonstrating an innovative effect when compared to a clinical drug, such as MEM, in this AD animal model.

## **6.6. Declarations**

### **6.6.1. Conflict of interests**

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this manuscript.

### **6.6.2. Financial support**

This study was supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Brazil.

## 6.7. References

- Aratani, Y. (2018) Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **640**, 47–52.
- Bedse, G., Romano, A., Cianci, S., Lavecchia, A.M., Lorenzo, P., Elphick, M.R., Laferla, F.M., Vendemiale, G., Grillo, C., Altieri, F., Cassano, T., & Gaetani, S. (2014) Altered expression of the CB1 cannabinoid receptor in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, **40**, 701–712.
- Benito, C., Tolón, R.M., Castillo, A.I., Ruiz-Valdepeñas, L., Martínez-Orgado, J.A., Fernández-Sánchez, F.J., Vázquez, C., Cravatt, B.F., & Romero, J. (2012)  $\beta$ -Amyloid exacerbates inflammation in astrocytes lacking fatty acid amide hydrolase through a mechanism involving PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$  and TRPV1, but not CB<sub>1</sub> or CB<sub>2</sub> receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **166**, 1474–1489.
- Birks, J. (2006) Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Birks, J.S. & Harvey, R.J. (2018) Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **2018**.
- Canevari, L., Abramov, A.Y., & Duchon, M.R. (2004) Toxicity of Amyloid  $\beta$  Peptide: Tales of Calcium, Mitochondria, and Oxidative Stress. *Neurochemical Research*, **29**, 637–650.
- Carvalho, A.A. V., Galdino, P.M., Nascimento, M.V.M., Kato, M.J., Valadares, M.C., Cunha, L.C., & Costa, E.A. (2010) Antinociceptive and antiinflammatory activities of grandisin extracted from *Virola surinamensis*. *Phytotherapy Research*, **24**, 113–118.
- Cazarin, C.A., Dalmagro, A.P., Gonçalves, A.E., Boeing, T., Silva, L.M. da, Corrêa, R., Klein-Júnior, L.C., Pinto, B.C., Lorenzetti, T.S., Sobrinho, T.U. da C., Fátima, Â. de, Lage, T.C. de A., Fernandes, S.A., & Souza, M.M. de (2021) Usnic acid enantiomers restore cognitive deficits and neurochemical alterations induced by A $\beta$ 1–42 in mice. *Behavioural Brain Research*, **397**.
- Centonze, D., Muzio, L., Rossi, S., Cavasinni, F., De Chiara, V., Bergami, A., Musella, A., D'Amelio, M., Cavallucci, V., Martorana, A., Bergamaschi, A., Cencioni, M.T., Diamantini, A., Butti, E., Comi, G., Bernardi, G., Cecconi, F., Battistini, L., Furlan, R., & Martino, G. (2009) Inflammation triggers synaptic alteration and degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroscience*, **29**, 3442–3452.
- Diniz, C.R.A.F., Rodrigues, M., Casarotto, P.C., Pereira, V.S., Crestani, C.C., & Joca, S.R.L. (2017) Monoamine involvement in the antidepressant-like effect induced by P2 blockade. *Brain Research*, **1676**, 19–27.
- 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. (2013) Memantine rescues transient cognitive impairment caused by high-molecular-weight A $\beta$  oligomers but not the persistent impairment induced by low-molecular-weight oligomers. *Journal of Neuroscience*, **33**, 9626–9634.
- Floden, A.M., Li, S., & Combs, C.K. (2005) Beta-amyloid-stimulated microglia induce neuron death via synergistic stimulation of tumor necrosis factor alpha and NMDA receptors. *J. Neurosci.*, **25**, 2566–2575.
- Food and Drug Administration; FDA (1997) Cognex Approval Letter [WWW Document].
- Food and Drug Administration; FDA (2000) Exelon Approval Letter [WWW Document].
- Food and Drug Administration; FDA (2004) Razadyne Approval Letter [WWW Document].
- Food and Drug Administration; FDA (2010) Aricept Approval Letter. *Approval Letter*, 13.
- Guo, T., Zhang, D., Zeng, Y., Huang, T.Y., Xu, H., & Zhao, Y. (2020) Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, **15**, 1–37.
- H. Ferreira-Vieira, T., M. Guimaraes, I., R. Silva, F., & M. Ribeiro, F. (2016) Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current Neuropharmacology*, **14**.
- Js, B., J, G.E., Birks, J.S., & Evans, J.G. (2015) Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*, 4–7.
- Khodadadi, H., Salles, É.L., Jarrahi, A., Costigliola, V., Khan, M.B., Yu, J.C., Morgan, J.C., Hess, D.C., Vaibhav, K., Dhandapani, K.M., & Baban, B. (2021) Cannabidiol Ameliorates Cognitive Function via Regulation of IL-33 and TREM2 Upregulation in a Murine Model of Alzheimer's Disease. *J*

*Alzheimers Dis*, **80**, 973–977.

- Lai, K.S.P., Liu, C.S., Rau, A., Lanctôt, K.L., Köhler, C.A., Pakosh, M., Carvalho, A.F., & Herrmann, N. (2017) Peripheral inflammatory markers in Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis of 175 studies. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, **88**, 876–882.
- Levine, R.L., Wehr, N., Williams, J.A., Stadtman, E.R., & Shacter, E. (2000) Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **99**, 15–24.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., & Feeney, P.J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25. 1. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **46**, 3–26.
- Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, B.G. (2013) Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and. *Nature Reviews Neuroscience*, **9**, 106–118.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., & RANDALL, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, **193**, 265–275.
- Lu, J., Zhang, H., Pan, J., Hu, Z., Liu, L., Liu, Y., Yu, X., Bai, X., Cai, D., & Zhang, H. (2021) Fargesin ameliorates osteoarthritis via macrophage reprogramming by downregulating MAPK and NF-κB pathways. *Arthritis Res Ther*, **23**, 142.
- Marcus, D.L., Thomas, C., Rodriguez, C., Simberkoff, K., Tsai, J.S., Strafaci, J.A., & Freedman, M.L. (1998) Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*, **150**, 40–44.
- Matsunaga, S., Kishi, T., & Iwata, N. (2015) Memantine monotherapy for Alzheimer's Disease: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, **10**, 1–16.
- McShane, R., Westby, M.J., Roberts, E., Minakaran, N., Schneider, L., Farrimond, L.E., Maayan, N., Ware, J., & Debarros, J. (2019) Memantine for dementia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **2019**, 1–446.
- Nani, A., Murtaza, B., Sayed Khan, A., Khan, N.A., & Hichami, A. (2021) Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential of Polyphenols. *Molecules*, **26**, 1–15.
- Nichols, E., Steinmetz, J.D., Vollset, S.E., Fukutaki, K., Chalek, J., Abd-Allah, F., Abdoli, A., Abualhasan, A., Abu-Gharbieh, E., Akram, T.T., Al Hamad, H., Alahdab, F., Alanezi, F.M., Alipour, V., Almustanyir, S., Amu, H., Ansari, I., Arabloo, J., Ashraf, T., Astell-Burt, T., Ayano, G., Ayuso-Mateos, J.L., Baig, A.A., Barnett, A., Barrow, A., Baune, B.T., Béjot, Y., Bezabhe, W.M.M., Bezabih, Y.M., Bhagavathula, A.S., Bhaskar, S., Bhattacharyya, K., Bijani, A., Biswas, A., Bolla, S.R., Bloor, A., Brayne, C., Brenner, H., Burkart, K., Burns, R.A., Cámara, L.A., Cao, C., Carvalho, F., Castro-de-Araujo, L.F.S., Catalá-López, F., Cerin, E., Chavan, P.P., Cherbuin, N., Chu, D.T., Costa, V.M., Couto, R.A.S., Dadras, O., Dai, X., Dandona, L., Dandona, R., De la Cruz-Góngora, V., Dhamnetiya, D., Dias da Silva, D., Diaz, D., Douiri, A., Edvardsson, D., Ekholuenetale, M., El Sayed, I., El-Jaafary, S.I., Eskandari, K., Eskandari, S., Esmailnejad, S., Fares, J., Faro, A., Farooque, U., Feigin, V.L., Feng, X., Fereshtehnejad, S.M., Fernandes, E., Ferrara, P., Filip, I., Fillit, H., Fischer, F., Gaidhane, S., Galluzzo, L., Ghashghaee, A., Ghith, N., Gialluisi, A., Gilani, S.A., Glavan, I.R., Gnedovskaya, E. V., Golechha, M., Gupta, R., Gupta, V.B., Gupta, V.K., Haider, M.R., Hall, B.J., Hamidi, S., Hanif, A., Hankey, G.J., Haque, S., Hartono, R.K., Hasaballah, A.I., Hasan, M.T., Hassan, A., Hay, S.I., Hayat, K., Hegazy, M.I., Heidari, G., Heidari-Soureshjani, R., Herteliu, C., Househ, M., Hussain, R., Hwang, B.F., Iacoviello, L., Iavicoli, I., Ilesanmi, O.S., Ilic, I.M., Ilic, M.D., Irvani, S.S.N., Iso, H., Iwagami, M., Jabbarinejad, R., Jacob, L., Jain, V., Jayapal, S.K., Jayawardena, R., Jha, R.P., Jonas, J.B., Joseph, N., Kalani, R., Kandel, A., Kandel, H., Karch, A., Kasa, A.S., Kassie, G.M., Keshavarz, P., Khan, M.A., Khatib, M.N., Khoja, T.A.M., Khubchandani, J., Kim, M.S., Kim, Y.J., Kisa, A., Kisa, S., Kivimäki, M., Koroshetz, W.J., Koyanagi, A., Kumar, G.A., Kumar, M., Lak, H.M., Leonardi, M., Li, B., Lim, S.S., Liu, X., Liu, Y., Logroscino, G., Lorkowski, S., Lucchetti, G., Lutzky Saute, R., Magnani, F.G., Malik, A.A., Massano, J., Mehndiratta, M.M., Menezes, R.G., Meretoja, A., Mohajer, B., Mohamed Ibrahim, N., Mohammad, Y., Mohammed, A., Mokdad, A.H., Mondello, S., Moni, M.A.A., Moniruzzaman, M., Mossie, T.B., Nagel, G., Naveed, M., Nayak, V.C., Neupane Kandel, S., Nguyen, T.H., Oancea, B., Otstavnov, N., Otstavnov, S.S., Owolabi, M.O., Panda-Jonas, S., Pashazadeh Kan, F., Pasovic, M., Patel, U.K., Pathak, M., Peres, M.F.P., Perianayagam, A., Peterson, C.B., Phillips, M.R., Pinheiro, M., Piradov, M.A., Pond, C.D., Potashman, M.H., Pottou,

- F.H., Prada, S.I., Radfar, A., Raggi, A., Rahim, F., Rahman, M., Ram, P., Ranasinghe, P., Rawaf, D.L., Rawaf, S., Rezaei, N., Rezapour, A., Robinson, S.R., Romoli, M., Roshandel, G., Sahathevan, R., Sahebkar, A., Sahraian, M.A., Sathian, B., Sattin, D., Sawhney, M., Saylan, M., Schiavolin, S., Seylani, A., Sha, F., Shaikh, M.A., Shaji, K.S., Shannawaz, M., Shetty, J.K., Shigematsu, M., Shin, J. Il, Shiri, R., Silva, D.A.S., Silva, J.P., Silva, R., Singh, J.A., Skryabin, V.Y., Skryabina, A.A., Smith, A.E., Soshnikov, S., Spurlock, E.E., Stein, D.J., Sun, J., Tabarés-Seisdedos, R., Thakur, B., Timalsina, B., Tovani-Palone, M.R., Tran, B.X., Tsegaye, G.W., Valadan Tahbaz, S., Valdez, P.R., Venketasubramanian, N., Vlassov, V., Vu, G.T., Vu, L.G., Wang, Y.P., Wimo, A., Winkler, A.S., Yadav, L., Yahyazadeh Jabbari, S.H., Yamagishi, K., Yang, L., Yano, Y., Yonemoto, N., Yu, C., Yunusa, I., Zadey, S., Zastrozhin, M.S., Zastrozhina, A., Zhang, Z.J., Murray, C.J.L., & Vos, T. (2022) Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Public Health*, **7**, e105–e125.
- Parisotto, E.B., Giarretta, A.G., Zamoner, A., Moreira, E.A.M., Fröde, T.S., Pedrosa, R.C., & Filho, D.W. (2015) Persistence of the benefit of an antioxidant therapy in children and teenagers with Down syndrome. *Research in Developmental Disabilities*, **45–46**, 14–20.
- Prickaerts, J., Steinbusch, H.W.M., Smits, J.F.M., & De Vente, J. (1997) Possible role of nitric oxide-cyclic GMP pathway in object recognition memory: Effects of 7-nitroindazole and zaprinast. *European Journal of Pharmacology*, **337**, 125–136.
- Qiu, C., Kivipelto, M., & Von Strauss, E. (2009) Epidemiology of Alzheimer's disease: Occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, **11**, 111–128.
- Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., Möbius, H.J., & Memantine Study Group (2003) Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.*, **348**, 1333–1341.
- Rondanelli, M., Faliva, M.A., Miccono, A., Naso, M., Nichetti, M., Riva, A., Guerriero, F., De Gregori, M., Peroni, G., & Perna, S. (2018) Food pyramid for subjects with chronic pain: foods and dietary constituents as anti-inflammatory and antioxidant agents. *Nutrition Research Reviews*, **31**, 131–151.
- Rutten, K., Reneerkens, O.A.H., Hamers, H., Şik, A., McGregor, I.S., Prickaerts, J., & Blokland, A. (2008) Automated scoring of novel object recognition in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, **171**, 72–77.
- Schmitt, F., Ph, D., Ferris, S., & Ph, D. (2006) Memantine in Alzheimer's disease. *Fortschritte der Neurologie Psychiatrie*, **74**, B12–B12.
- Tao, T., Liu, M., Chen, M., Luo, Y., Wang, C., Xu, T., Jiang, Y., Guo, Y., & Zhang, J.H. (2020) Natural medicine in neuroprotection for ischemic stroke: Challenges and prospective. *Pharmacology and Therapeutics*, **216**, 107695.
- Thawkar, B.S. & Kaur, G. (2019) Inhibitors of NF-κB and P2X7/NLRP3/Caspase 1 pathway in microglia: Novel therapeutic opportunities in neuroinflammation induced early-stage Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol*, **326**, 62–74.
- Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., & Nair, M. (2019) Alzheimer's disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International Journal of Nanomedicine*, **14**, 5541–5554.
- Valadares, M.C., De Oliveira Júnior, L.M., De Carvalho, F.S., Andrade, L.V.S., Dos Santos, A.P., De Oliveira, V., De Souza Gil, E., & Kato, M.J. (2011) Chemoprotective effect of the tetrahydrofuran lignan grandisin in the in-vivo rodent micronucleus assay. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **63**, 447–451.
- Xu, X., Piao, H.-N., Aosai, F., Zeng, X.-Y., Cheng, J.-H., Cui, Y.-X., Li, J., Ma, J., Piao, H.-R., Jin, X., & Piao, L.-X. (2020) Arctigenin protects against depression by inhibiting microglial activation and neuroinflammation via HMGB1/TLR4/NF-κB and TNF-α/TNFR1/NF-κB pathways. *Br J Pharmacol*, **177**, 5224–5245.
- Zhai, H., Inoue, T., Moriyama, M., Esumi, T., Mitsumoto, Y., & Fukuyama, Y. (2005) Neuroprotective Effects of 2,5-Diaryl-3,4-dimethyltetrahydrofuran Neolignans. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **28**, 289–293.