



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Ciências Fisiológicas  
Laboratório de Neurofarmacologia  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**Avaliação da atividade antiamiloidogênica de peptídeos isolados da peçonha de vespas sociais em um modelo murino da doença de Alzheimer**

**Brasília**  
**Março, 2019**



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Ciências Fisiológicas  
Laboratório de Neurofarmacologia  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**Avaliação da atividade antiamiloidogênica de peptídeos isolados da peçonha de vespas sociais em um modelo murino da doença de Alzheimer**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Aluna: Letícia Alves Gomes

Orientadora: Márcia Renata Mortari

**Brasília**  
**Março, 2019**

## **Agradecimento**

À minha orientadora Márcia, por ter me acolhido e por todo os ensinamentos, carinho e compressão ao longo desses anos.

Ao professor Osmino, por ter renovado o meu encanto pela pesquisa.

Aos companheiros de laboratório Andreia, Adolfo, Danilo, Gabriel, Henrique, Jacqueline, Kamila, Lílian, Luana, Matheus, Maria, Priscila, Victória por todo o aprendizado, companhia, cafés e conversas.

Aos meus pais, por serem minha principal inspiração, orgulho e motivação para este trabalho.

À minha querida avó, Leontina, que certamente estaria muito orgulhosa da “neguinha da vó”.

À Jessica, minha prima-irmã, pela amizade, companheirismo e apoio, independente de tudo.

Ao David, por ser meu porto seguro, minha calma em meio as tempestades dessa vida.

À Sarah e Yuri, pela amizade sincera e pelas conversas que me ajudaram a crescer e a acreditar em mim.

Aos meus amigos de trabalho Guilherme, João e Laryssa, fundamentais para me ajudar a equilibrar trabalho e pesquisa.

Ao Rafael e Victor, presentes que a biologia me deu, e que seguem do meu lado até hoje.

Ao PPG BioAni, pela oportunidade.

Aos animais, pelo sacrifício

*“Remember why you  
started”*

## Resumo

Os avanços na medicina possibilitam, cada vez mais, a longevidade da população mundial. Porém, o aumento no número de pessoas idosas traz como consequência diversos problemas de saúde comuns nessa faixa etária. A principal teoria que explica o surgimento da doença de Alzheimer (DA) é o acúmulo de um peptídeo chamado  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A). O acúmulo deste peptídeo no espaço extracelular forma um composto insolúvel que inicia uma cascata de eventos neuroinflamatórios, com ativação da micróglia e astrócitos, culminando na perda de neurônios e extensos déficits nas funções executivas. Atualmente, não está disponível para a terapia um fármaco que consiga reverter ou mesmo impedir a progressão da DA. Por isso, são importantes as pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos focadas nesta área. Este trabalho busca avaliar a ação de anti agregação dos peptídeos sintéticos fraternina-10 e octovespina em um modelo murino da DA, induzida pela agregação do peptídeo  $\beta$ A. Para o modelo experimental, os animais foram divididos em *sham*, doentes e tratados por uma semana com a fraternina-10 (três doses) ou com a octovespina (uma dose), todos administrados via subcutânea. Para a avaliação de déficits cognitivos, os indivíduos foram desafiados em três ensaios comportamentais: campo aberto (CA), reconhecimento de objeto novo (RON) e o labirinto aquático de Morris (LAM), que avaliam o comportamento espontâneo, a memória de curto e de médio prazo. Após os ensaios comportamentais, os cérebros dos animais foram marcados com Tioflavina T e DAPI para a quantificação dos agregados de  $\beta$ A. As administrações de ambos os peptídeos resultaram em uma melhora cognitiva dos animais. O CA mostrou que o tratamento não causou comprometimento motor nos animais. Já o RON mostrou que os animais tratados com a dose de 12mg/kg de fraternina-10 e com a octovespina tiveram uma melhora significativa quando comparados ao grupo doente. Porém, essa melhora não se manteve durante todos os dias dos ensaios comportamentais. Uma possível explicação é que os peptídeos devem ter sido degradados pelo corpo dos animais e, ao final de 144 horas sem receber tratamento, a biodisponibilidade dos peptídeos já não era suficiente e os sinais da DA reestabelecidos. Apesar disso, as análises histológicas mostraram que houve uma pequena redução no número de agregados de  $\beta$ A tratados com 12 mg/kg de fraternina-10 e 4mg/kg de octovespina.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, peptídeos, Vespas sociais, anti amiloidogênico.

## Abstract

Advances in medicine make possible to increase the longevity of the world's population. However, the increase in the number of elderly people results in several common health problems in this age group. The main theory that explains the emergence of AD is the accumulation of a peptide called  $\beta$ -amyloid. The accumulation of this peptide in the extracellular space forms an insoluble compound that initiates a cascade of neuroinflammatory events, with activation of the microglia and astrocytes, resulting in the loss of neurons and extensive deficits in the executive functions. Currently, a drug that reverses or even prevents the progression of AD is not available for therapy. Therefore, there are important research for the development of new drugs focused in this area. To this end, the researchers look for compounds that have affinity in the central nervous system, like peptides found in the venom of arthropods. These animals have been used as a source of new drugs for many years, now being purified and having their functions better defined. The aim of this work is to evaluate the anti-aggregation action of synthetic peptides fraternina-10 and octovespina in a murine model of AD, induced by the aggregation of the  $\beta$ A peptide. For the experimental model, the animals were divided into sham,  $\beta$ A and treated for one week with a fraternina-10 (three doses) or with octovespina, all administered subcutaneously. In the evaluation of cognitive deficit, subjects were challenged in three important behaviors tests: open field (OF), new object recognition (NOR) and the Morris water maze (MWM), which assess spontaneous behavior, short and medium term memory. After the behavioral assays, the animals' brains were labeled with Thioflavin T and DAPI for a quantification of the aggregates of  $\beta$ A. The administrations of both peptides resulted in better cognition of the animals. OF showed that the treatment did not cause motor impairment in animals. NOR, however, showed that animals treated with the 12 mg / kg dose of fraternina-10 and octovespina had a significant improvement when compared to the sick group. However, this improvement did not last for all the days of the behavioral tests. One possible explanation is that the peptides must have been degraded by the animals' bodies and, at the end of 144 hours without treatment, the bioavailability of the peptides was not enough and the AD signs reestablished. Despite this, histological analyzes showed that there was a small reduction in the number of A $\beta$  aggregates treated with 12 mg / kg of fraternina-10 and 4 mg / kg of octovespina.

Keywords: Alzheimer's disease, peptides, social wasps, anti amyloidogenic.

## Lista de figuras

Figura 1: Esquema representativo das regiões do cérebro responsáveis pela formação e armazenamento de alguns tipos de memória (fonte própria) .....	14
Figura 2: Via colinérgica que irriga as regiões responsáveis pela memória no lobo temporal medial (fonte própria).....	16
Figura 3: Vias catalíticas da PPA. A atuação da alfa-secretase e da gama-secretase liberam peptídeos que não são nocivos ao cérebro. Já na via amiloidogênica, a atuação da beta-secretase, seguida pela gama-secretase, origina o peptídeo beta-amiloide no meio extracelular (fonte própria).....	20
Figura 4: Sequência de aminoácidos do peptídeo beta-amiloide 42 e a sua principal região hidrofóbica sendo destacada (fonte própria). .....	21
Figura 5: Esquema representativo da propagação da beta-amiloide e da proteína TAU ao longo do desenvolvimento da doença de Alzheimer. A coloração indica as áreas do cérebro afetadas. Em amarelo há dano leve, em laranja moderado e vermelho representa dano grave a região (fonte própria). .....	23
Figura 6:Esquema representativo da ativação da micróglia, podendo alterar seu estado para M1 ou M2. Cada estado ativado libera substâncias diferentes e possuem funções diferentes no cérebro (fonte própria). .....	28
Figura 7: Esquema representativo dos processos que ocorrem na célula após o acúmulo de beta-amiloide e TAU. Diferentes reações se iniciam no cérebro, como a ativação da micróglia e astrócitos, que produzem citocinas pró-inflamatórias, interleucinas, óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio e fator de necrose tumoral, que podem levar a morte celular, além de retroalimentar a fosforilação de TAU. Outra via é iniciada com a hiperativação do receptor NMDA, que resulta na excitotoxicidade glutamatérgica. Isso intensifica o estresse oxidativo, levando a necrose e inicia a cascata apoptótica (fonte própria). .....	32
Figura 8: Representação do local de inserção da cânula guia para a injeção da beta-amiloide no ventrículo direito (fonte Atlas de Franklin & Paxinos 1997). .....	39
Figura 9: Esquema representativo do cronograma utilizado neste estudo. O tratamento se inicia no dia 1, logo após a neurocirurgia, e segue até o dia 7. Após a administração da última dose, começam os ensaios comportamentais: campo aberto (CA), reconhecimento de objeto novo (RON) e finalizando com o labirinto aquático de Morris (LAM). Ao final dos ensaios comportamentais, os animais são perfundidos para posterior análise histológica (fonte própria). .....	40
Figura 10: Foto do ensaio campo aberto. O animal foi colocado na arena no dia anterior por 15 minutos para adaptação. No dia do teste, o animal foi colocado na arena novamente por 15 minutos e foram analisados seus comportamentos espontâneos, como elevação, imobilidade e autolimpeza (fonte própria). .....	42
Figura 11: Fotos do teste RON. O animal foi colocado na caixa vazia no dia anterior ao teste para habituação. No dia do teste, o animal foi apresentado a dois objetos iguais (Objeto Familiar) por cinco minutos. Após um intervalo de 15 minutos, o animal foi colocado novamente na caixa, agora com um Objeto Familiar e um Objeto Novo (fonte própria). .....	43
Figura 12: Esquema da sala onde ocorreu o LAM. Os animais foram colocados em um recipiente com água, no qual havia uma plataforma. O animal deveria usar as pistas visuais nas paredes como referência e memorizar o quadrante em que a plataforma se encontrava. Após 4 dias de treinamento, a plataforma era retirada e o animal permanecia por 60 segundos no recipiente e depois retirado (fonte própria). .....	44
Figura 13: Representação da região CA1 da formação hipocampal, de onde foram tiradas as fotos para análises histológicas (fonte Atlas de Franklin & Paxinos 1997). .....	46

Figura 14: Gráfico da distância percorrida, em centímetros, pelos animais na área do CA. A análise estatística realizada foi a ANOVA, porém ela não mostrou diferença entre os grupos controle e tratados com fraternina-10. ....	47
Figura 15: Gráfico da análise do tempo (em segundos) em que os animais ficaram imóveis no teste do CA. A análise estatística realizada foi a ANOVA, porém, este teste não mostrou diferença entre os grupos. ....	48
Figura 16: Representação, em segundos, do tempo de autolimpeza dos animais controle e tratados com a fraternina-10. A ANOVA não mostrou diferença entre os grupos representados. ....	48
Figura 17: Análise do tempo de elevação dos animais durante o teste do CA. A ANOVA não mostrou diferença entre os grupos analisados. ....	49
Figura 18: Representação do tempo que os animais permaneceram no círculo central do aparato do CA. A análise estatística realizada foi a ANOVA, porém ela não mostrou diferença entre os grupos analisados. ....	50
Figura 19: Representação do tempo que os animais permaneceram no círculo mais externo do aparato do CA. A análise estatística realizada foi a ANOVA, porém ela não mostrou diferença entre os grupos analisados. ....	50
Figura 20: Análise da distância percorrida da arena do CA para observar os efeitos da octovespina. A ANOVA realizada não mostrou diferença significativa entre os grupos analisados. ....	51
Figura 21: Gráfico da análise do tempo em que os animais ficaram imóveis no aparato durante o teste do CA. ANOVA foi realizada e não mostrou diferença entre os grupos. ....	51
Figura 22: Representação, em segundos, do tempo de autolimpeza dos animais tratados com octovespina em comparação aos grupos controle. A ANOVA não mostrou diferença entre os grupos representados. ....	52
Figura 23: Análise do tempo de elevação dos animais durante o teste do CA. O grupo octovespina mostrou diferença significativa em relação ao grupo <i>sham</i> em a ( $P < 0,05$ )....	52
Figura 24: Representação do tempo que os animais permaneceram no círculo central do aparato do CA. A análise estatística ANOVA não mostrou diferença entre os animais tratados com octovespina e os demais grupos. ....	53
Figura 25: Representação do tempo que os animais permaneceram no círculo mais externo do aparato do CA. A análise estatística ANOVA não mostrou diferença entre os animais tratados com a octovespina e os demais grupos. ....	53
Figura 26: Índice de exploração dos animais, mostrando quando há uma diferença pelo objeto novo ou pelo objeto familiar. A ANOVA mostrou diferença significativa entre os grupos <i>sham</i> e BA representado em c* ( $P < 0,01$ ) e entre os grupos BA e Fra-10 12mg/kg, representado em b ( $P < 0,05$ ).....	54
Figura 27: Índice de exploração dos animais, mostrando quando há uma diferença pelo objeto novo ou pelo objeto familiar. A ANOVA mostrou diferença significativa entre os grupos <i>sham</i> e BA, representado em c* ( $P < 0,01$ ) e entre os grupos BA e Fra-10 12mg/kg, mostrado em b ( $P < 0,05$ ).....	55
Figura 28: Representação do tempo que os animais demoraram para encontrara a plataforma ao longo dos dias de treinamento. A ANOVA de duas vias mostrou que houve diferença significativa entre o grupo <i>sham</i> e $\beta$ A nos dias 3 e 4 de treinamento, representado por c ( $P < 0,05$ ). ....	56
Figura 29: Latência do tempo em que os animais demoraram para achar a plataforma ao longo dos dias de treino do LAM. A ANOVA de duas vias mostrou que houve diferença significativa entre o grupo <i>sham</i> e $\beta$ A nos dias 3 e 4 de treinamento, representado por c ( $P < 0,05$ ). ....	57
Figura 30: Distância percorrida em centímetros pelos animais no aparato aquático. Não houve diferença entre os grupos segundo a análise ANOVA .....	59

Figura 31: Representação gráfica do número de entradas no quadrante em que se encontrava a plataforma durante os dias de treino. Não houve diferença entre os grupos segundo a ANOVA.....	60
Figura 32: Tempo que os animais permaneceram no quadrante em que estava a plataforma. Estes dados corroboram com o trabalho de Camargo (2017). A ANOVA mostrou diferença significativa entre o grupo $\beta$ A e o tratado com 4 mg/kg de fraternina-10, representado por b ( $P < 0,05$ ).....	61
Figura 33: Distância percorrida em centímetros pelos animais no aparato aquático, comprovando que não houve comprometimento motor ao longo dos dias de ensaio comportamental. Não houve diferença significativa entre os grupos analisados segundo a ANOVA.....	61
Figura 34: Distância percorrida em centímetros pelos animais no aparato aquático. A ANOVA mostra diferença entre os grupos <i>sham</i> e o grupo $\beta$ A, representado por c ( $P < 0,05$ ).....	62
Figura 35: Tempo que os animais permaneceram no quadrante em que estava a plataforma. Estes dados corroboram com o trabalho de Camargo (2017). A ANOVA mostrou que há uma diferença entre os dados do grupo <i>sham</i> e $\beta$ A, representado por c ( $P < 0,05$ ) e também entre os grupos $\beta$ A e o grupo tratado com a octovespina, representado por b ( $P < 0,05$ ).....	63
Figura 36: Amostras dos cortes histológicos feitos com a marcação de DAPI e Tioflavina T64	
Figura 37: Média da quantidade de agregados de $\beta$ A encontrados nas amostras histológicas. A análise estatística ANOVA mostrou diferença significativa entre os grupos <i>sham</i> e $\beta$ A, representada por c ( $P < 0,05$ ); diferença significativa entre o grupo <i>sham</i> e a dose de fraternina-10 de 4 mg/kg (no qual a representa valos de $P < 0,05$ ) e entre o grupo <i>sham</i> e o grupo tratado com a dose de 8 mg/kg de fraternina-10, representado por a* ( $P < 0,01$ ). .....	65
Figura 38: Representação da quantidade de agregados de BA nos cortes histológicos comparando os grupos com o tratamento com octovespina. A ANOVA mostrou que há uma diferença significativa no número de agregados dos grupos <i>sham</i> e $\beta$ A, representado por c ( $P < 0,05$ ).....	66

## Lista de abreviações

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

AMPA – alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

$\beta$ A – Beta-amiloide

$\beta$ A40 – Beta-amiloide 40

$\beta$ A42 – Beta-amiloide 42

CA – Campo Aberto

CEUA – Comissão Ética em Uso Animal

ChAT – Colina Acetiltransferase

DA – Doença de Alzheimer

ENF – Emaranhados Neurofibrilares

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

IB – Instituto de Biologia

icv – Intracerebroventricular

LAM – Labirinto Aquático de Morris

LTP – *Long Term Potential*

LTD – *Long Term Depression*

NMDA – N-metil-D-aspartato

ON – Óxido Nítrico

PPA – Proteína Precursora de Amiloide

RON – Reconhecimento de Objeto Novo

SNC – Sistema Nervoso Central

## Sumário

1. Introdução.....	12
1.1. Áreas acometidas pela DA.....	14
1.2. Hipóteses etiológicas da DA .....	15
1.2.1. Hipótese colinérgica.....	15
1.2.2. Hipótese da hiperfosforilação da proteína TAU.....	17
1.2.3. Hipótese amiloidogênica .....	19
1.2.4. TAU x $\beta$ A .....	22
1.3. Fatores de risco .....	24
1.4. Neuroinflamação e neurodegeneração .....	27
1.5. Excitotoxicidade glutamatérgica, estresse oxidativo e cascata apoptótica .....	30
1.6. Tratamento .....	32
2. Objetivos.....	37
2.1. Objetivos específicos .....	37
3. Material e métodos .....	38
3.1. Animais.....	38
3.2. Protocolo experimental .....	38
3.2.1. Grupos experimentais .....	40
3.2.2. Teste do Campo Aberto (CA).....	41
3.2.3. Teste de Reconhecimento de Objeto Novo (RON).....	42
3.2.4. Labirinto Aquático de Morris (LAM) .....	43
3.2.5. Análises histológicas.....	44
3.2.6. Análise estatística .....	46
4. Resultados e discussão .....	47
4.1. Campo Aberto.....	47
4.2. Reconhecimento de Objeto Novo .....	53
4.3. Labirinto Aquático de Morris .....	55
4.4. Análises histológicas.....	63
4.5. Análise dos peptídeos.....	66
5. Conclusão.....	68
6. Referências Bibliográficas.....	69
7. Anexos.....	79

## 1. Introdução

Há muitas décadas, os pesquisadores tentam determinar os diversos aspectos etiológicos da Doença de Alzheimer (DA). Ela, uma doença complexa e de detecção tardia, vem afetando cada vez mais indivíduos na população mundial (Müller, 2017), totalizando aproximadamente 40 milhões de pessoas diagnosticadas. Mesmo assim, o número real deve ser muito maior, uma vez que seus primeiros sinais só aparecem depois de décadas do início da doença (Selkoe, 2016).

A DA é uma patologia neurodegenerativa, responsável pela maior parte dos casos de demência senil, representando de 50-75% dos casos (Cavanaugh, 2014). Com o envelhecimento da população mundial, acredita-se que o número de casos desta doença aumente em grandes proporções nas próximas décadas. Além disso, por não haver um medicamento efetivo para o tratamento e a cura da DA, esta patologia gera grandes custos diretos e indiretos ao paciente e ao Estado. Estima-se que, no ano de 2010, foram gastos aproximadamente 600 bilhões de dólares no tratamento de pacientes com a DA em todo o mundo, número que deve triplicar até 2050 (Huang, 2012; Lundkvist, 2014).

Em 1907, Alois Alzheimer, psiquiatra e neuropatologista alemão, descreveu o resultado de uma análise *post mortem* de uma mulher que sofreu de demência pré-senil progressiva. Nesse estudo, ele descreve que sua paciente teve uma rápida e crescente perda de memória, além da perda da orientação no tempo e espaço, e que faleceu quatro anos e meio após o estabelecimento da doença. Durante a necrópsia, Alzheimer verificou que o cérebro de sua paciente estava atrofiado, com volume reduzido, com patologia neurofibrilar e presença de depósitos proteicos no córtex. Este estudo foi pioneiro para a descoberta e caracterização desta doença, que hoje leva o nome de Doença de Alzheimer (Small et al 2006).

Inicialmente, a DA é caracterizada por lapsos de memória, seguida do declínio de outras funções cognitivas (Götz, 2008). A forma mais comum ocorre em pacientes idosos, acometendo cerca de 10% de pessoas acima de 65 anos e aproximadamente 50% de pessoas acima de 85 anos. Quando a doença começa a se manifestar em idade mais avançada, ela é classificada como DA esporádica. Além disso, aproximadamente 5-6% dos casos ocorre precocemente em pessoas com idade inferior a 65 anos. Estes casos possuem uma forte influência genética e são classificados como DA Familiar (Kumar, 2016; Cavanaugh, 2014; Van Dam, 2011).

Em todos os casos, a DA é assintomática em seu início. Sua progressão pode ser dividida em três estágios: pré-clínico (sem sinais ou sintomas), comprometimento cognitivo leve e demência (Kumar, 2016). Durante o estágio pré-clínico, que pode durar décadas, o

paciente não apresenta sinais clínicos evidentes da doença, mas durante esse período, ocorre o acúmulo do peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) e formação de emaranhados neurofibrilares da proteína TAU. Com a sua progressão, os primeiros sinais de esquecimento e dificuldade com atividades cotidianas se iniciam. Os sinais da doença vão se tornando gradativamente mais evidentes e frequentes, como problemas severos de memória, desorientação espacial e visual, falta de equilíbrio, problemas nas funções motoras, entre outros. Além do déficit cognitivo, há também uma série de comportamentos e sinais psicológicos relacionados ao início da demência, por exemplo sinais de agressão e agitação, depressão, ansiedade, além de alucinações. Com a progressão da doença, o paciente, já em estágio avançado de demência, muitas vezes fica retido em uma cadeira de rodas ou acamado, devido a problemas de locomoção. Geralmente, quando ocorre o diagnóstico da DA, a expectativa de vida do paciente tende a se estender por mais cinco a sete anos (Cavanaugh, 2014; Selkoe, 2003).

O déficit de memória é um sinal marcante da DA, pois tipicamente é o primeiro a se manifestar nesta doença. Porém, nem todos os tipos de memória são afetados nesta condição. Além disso, problemas de evocação na memória episódica (autobiográfica) e na memória de procedimento são frequentes em pessoas saudáveis, podendo ser influenciada por fatores como estresse e depressão. Com isso, quando uma pessoa com DA apresenta estes pequenos lapsos de memória, dificilmente ela associa a um problema neurológico, dificultando o diagnóstico precoce. No entanto, as causas fisiológicas desse gradual déficit de memória ainda estão em controvérsia (Selkoe, 2003; Faucher, 2016).

Análises *post mortem* do cérebro de indivíduos com a DA ajudam a elucidar a causa dos problemas de memória como primeiros sinais desta doença. A memória episódica está associada a região da formação hipocampal, já a de procedimento está associada ao córtex pré-frontal medial, regiões muito afetadas nesta doença (Faucher, 2016). Amostras do cérebro de indivíduos com DA em estágios mais avançados mostram que também há o comprometimento de estruturas subcorticais como o complexo amigdalóide e o núcleo basal de Meynert (Götz, 2008), justificando o comprometimento motor decorrente do avanço da doença.

A DA é ocasionada por uma interação entre diversos fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, que resultam em neuroinflamação e processo apoptótico anormal, bem como a formação de placas de  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) e emaranhados neurofibrilares (ENF) (Huang, 2012; Götz, 2008; Bagyinszky, 2017). Vale ressaltar que o acúmulo progressivo da amiloide é responsável por causar diversas doenças, como artrite reumatóide, psoríase e doença de Crohn (Selkoe, 2016).

### 1.1. Áreas acometidas pela DA

Inicialmente, a memória está associada à região hipocampal. Esta região está localizada no lobo temporal medial, sendo composta pelo subículo, giro denteado, Corno de Amon (dividido em CA1, CA2 e CA3) e o córtex entorrinal. A DA está fortemente associada a um processo acelerado de atrofia da região hipocampal e do córtex cerebral. Além destas regiões, também são afetadas o complexo amigdalóide, substância nigra, tálamo, hipotálamo, formação reticular e núcleos do tronco encefálico. Células não neuronais também são afetadas pela DA: astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e vasos sanguíneos. Porém, os sinais dessa doença não se iniciam apenas após a morte celular. A disfunção sináptica se inicia desde o começo da doença, resultando em uma perda sináptica (Kocahan, 2017).

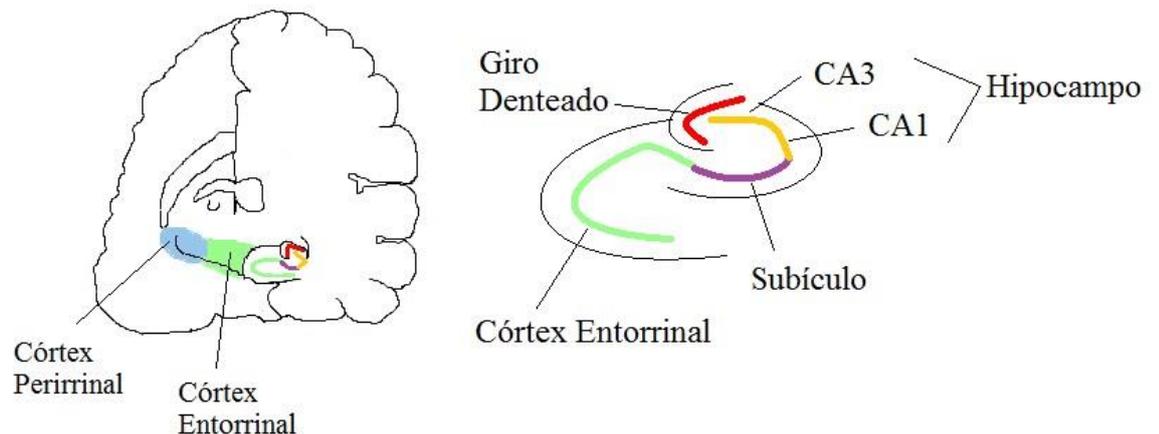


Figura 1: Esquema representativo das regiões do cérebro responsáveis pela formação e armazenamento de alguns tipos de memória (fonte própria)

Estudos em roedores mostraram que a área relacionada com a memória de reconhecimento de itens específicos é o córtex perirrinal, localizado no lobo temporal medial. Ainda em roedores, a área do cérebro relacionada a identificar a localização espacial de um item previamente apresentado é a formação hipocampal. Isso mostra que diferentes áreas do cérebro estão relacionadas com diferentes tipos de memória. Porém, apesar dessa especialização em diferentes regiões, é evidente que o funcionamento dessas regiões, somado a garantia da comunicação entre elas, são fundamentais para o processamento da memória (Warburton, 2015).

Para a formação de novas memórias ou durante o processo de aprendizado, ocorre o fortalecimento de sinapses que já existiam anteriormente ou há a formação de novas

comunicações entre os neurônios. Dois processos estão associados a isso: o potencial de longa duração (*long term potential* – LTP) e o potencial de longa depressão (*long term depression* – LTD). Ambos causam alterações morfológicas e elétricas na transmissão sináptica.

O LTP é dependente da ativação glutamatérgica do receptor pós-sináptico NMDA. Uma vez ativado, esse receptor permite o influxo de cálcio, dando início a uma cascata bioquímica com a ativação da proteína quinase cálcio-calmodulina dependente, gerando modificações pós-transcricionais. Com isso há o aumento de receptores AMPA na membrana plasmática do neurônio pós-sináptico, intensificando a comunicação entre esses neurônios. Mutações no receptor glutamatérgico NMDA levam a um bloqueio do LTP e gera um déficit de aprendizado associado a problemas de memória (Lisman, 2018).

Já o LTD também está associado a este receptor, porém gerando resultados contrários. Neste processo, os receptores do tipo AMPA, necessários para ativação do NMDA, sofrem endocitose, o que diminui a força sináptica (Banko, 2006, Izquierdo, 1997). Deste modo, é possível ver a importância de sinapses excitatórias na formação da memória e como a regulação desses processos bioquímicos são essenciais para a célula.

Pessoas com DA possuem uma diminuição nessas reações bioquímicas, pois a  $\beta$ A e a TAU interferem diretamente nesses processos. Os emaranhados de TAU são muito encontrados na região do subículo e CA1, além de os neurônios colinérgicos da formação hipocampal serem sensíveis ao processo inflamatório na DA (Hyman, 1984).

## **1.2. Hipóteses etiológicas da DA**

As principais hipóteses sobre os mecanismos moleculares que levam ao declínio cognitivo na DA são: o acúmulo e agregação do peptídeo  $\beta$ A, a perda de neurônios colinérgicos e a hiperfosforilação da proteína TAU.

### **1.2.1. Hipótese colinérgica**

A hipótese mais antiga que tenta explicar os acontecimentos ao longo da progressão da DA é conhecida como colinérgica. Pacientes com essa doença mostraram redução na atividade da colina acetiltransferase (ChAT), da acetilcolinesterase (AChE) e na síntese e liberação de acetilcolina (ACh). Essa hipótese surgiu da análise *post mortem* de indivíduos com DA, em que mostrava uma redução no número de neurônios colinérgicos, especialmente na região do núcleo basal de Meynert (Figura 2) (Bohnen, 2018).

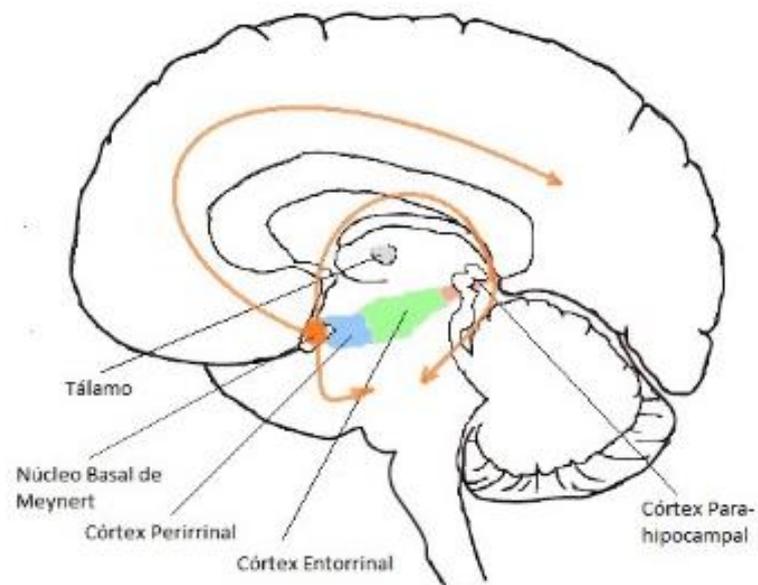


Figura 2: Via colinérgica que irriga as regiões responsáveis pela memória no lobo temporal medial (fonte própria).

A ACh possui diversas funções no corpo, como a contração dos músculos do sistema digestório, contração da bexiga e pupila, vasodilatação e diminuição do ritmo cardíaco. A resposta gerada pela estimulação colinérgica vai depender do tipo de receptor que a ACh se liga. Os receptores colinérgicos pós-sinápticos são divididos em muscarínicos e nicotínicos. Quando liberada no espaço sináptico, a ACh é metabolizada pela AChE, decompondo-a e colina e ácido acético (Silva, 2015).

Uma das metodologias utilizadas para determinar a função da ACh em funções cognitivas consistia em tentar induzir sinais através da administração de fármacos específicos, como a escopolamina. Foi possível observar que, em um mesmo teste de memória, a administração de fármacos bloqueadores de receptores muscarínicos gerou problemas cognitivos e estados de amnésia transitória, enquanto que o grupo que não recebeu o fármaco se manteve estável. Isso sugeriu que a ACh tem um papel importante no processo cognitivo (Hampel, 2018).

Em 1976, foram analisados cérebros de pacientes que faleceram em decorrência da DA e comparados a pacientes sem DA. O primeiro grupo apresentava a enzima ChAT com atividade significativamente reduzida (entre 60 a 90%) quando comparados ao grupo sem a doença (Coyle, 1983). Pouco tempo depois, um estudo concluiu que determinadas dosagens de fisostigmina, um bloqueador da AChE, resultavam em uma melhora da memória em primatas idosos. Isso gerou a hipótese colinérgica para a disfunção de memória em idosos em 1982, por Bartus e colaboradores. A DA mostrou ter uma relação direta com o dano colinérgico. Desta forma, animais com lesões colinérgicas e que apresentavam problemas

cognitivos, foram caracterizados como modelos de DA. Pouco tempo depois esta passou a ser a hipótese colinérgica para a DA (Hampel, 2018).

Estudos mostraram que a diminuição da atividade colinérgica ocorre pela inatividade da enzima ChAT. Essa inativação ocorre devido à interação da ChAT com a  $\beta$ A de diferentes isoformas, não estando diretamente relacionada com o processo inflamatório que ocorre na DA. Além disso, a AChE acelera a formação de agregados de  $\beta$ A, formando um complexo  $\beta$ A-AChE (Dinamarca, 2010). Esse complexo altera a função sináptica na formação hipocampal e aumenta a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Também foi comprovado que há uma elevada afinidade entre a  $\beta$ A e neurônios colinérgicos, diferente do que ocorre em neurônios gabaérgicos, sobre o qual a  $\beta$ A possui pouco ou nenhum efeito. Deste modo, a via colinérgica que irriga a região hipocampal fica comprometida. Não havendo a síntese de ACh, não há ativação dos receptores colinérgicos e nem despolarização dos neurônios desta região (Coyle, 1983; Pedersen, 1996).

Essa teoria ainda é reforçada por estudos que mostraram que a redução da quantidade de receptores muscarínicos e nicotínicos, alvos da ACh, diminui a função cognitiva. Comprovando ainda mais a aplicabilidade desta teoria, a maior parte dos fármacos atuais existentes para o tratamento da DA são inibidores da AChE ou agonistas colinérgicos.

### **1.2.2. Hipótese da hiperfosforilação da proteína TAU**

Uma vez que a hipótese colinérgica ainda não foi totalmente confirmada, há uma outra hipótese que tenta explicar o aparecimento da DA: a hipótese da proteína TAU. Esta é uma proteína de membrana, hidrofílica, associada a microtúbulos, sendo encontrada principalmente em neurônios e células da glia, abundantemente nos axônios e em menor quantidade nos dendritos. Ela é estável em meio ácido e em altas temperaturas, faz parte da composição do citoesqueleto e, além disso, se mostra muito versátil. Essa proteína também se associa a filamentos de actina, proteínas motoras e quinases, estando no citosol ou no meio externo aos neurônios e interagindo com diferentes alvos. Porém, mudanças nesta proteína podem desestabilizar o citoesqueleto da célula, alterando sua conformação e interações, destruindo sinapses e causando a morte neuronal (Krüger 2016; Nisbet, 2015). O acúmulo de proteína TAU no cérebro de pacientes com DA foi descrito pela primeira vez em 1986 (Kocahan, 2017).

O gene MAPT, responsável por esta proteína, está localizado no cromossomo 17q21 e, através de *splicing* alternativo, pode formar seis isoformas de TAU. A estrutura de suas diferentes isoformas é marcada por três ou quatro sítios de ligação com microtúbulos bem conservadas e, desde o desenvolvimento embrionário até a fase adulta, essas regiões

recebem uma molécula de fosfato, processo chamado de fosforilação (Andreeva, 2017; Nisbet, 2015). Também há em sua estrutura diversos resíduos de aminoácidos que potencialmente podem ser fosforilados, especialmente serina, treonina e tirosina (Dansokho, 2017).

Diversas enzimas realizam essa função de fosforilação da TAU, como por exemplo a MAPquinase, proteína quinase A e a cálcio-calmodulina proteína quinase 2. Porém, quanto mais fosforilada esta região estiver, menor será a sua afinidade com o microtúbulo. Observando as formas encontradas, a TAU em fetos humanos apresenta aproximadamente sete fosfatos, enquanto que em um adulto há apenas dois fosfatos por molécula. Quando hiperfosforilada, essa proteína pode ter oito fosfatos ligados a sua estrutura. Este número pode variar, pois também há atuação de fosfatases, enzimas que retiram a molécula de fosfato, durante o período do óbito até a coleta das amostras do cérebro para os estudos. Mesmo sem saber ao certo o número de fosfatos, na DA, a TAU é fosforilada especialmente em regiões de ligação com microtúbulos, rompendo sua interação e desestabilizando o citoesqueleto (Barage, 2015; Kocahan, 2017).

A fosforilação possui um importante papel na regulação do funcionamento da TAU, que tem por consequência a função de regular a estabilização e montagem dos microtúbulos, portanto sua desregulação pode causar uma série de efeitos nocivos à célula. Uma possibilidade é a disfunção sináptica, uma vez que a TAU hiperfosforilada danifica a ligação entre o axônio e o compartimento somatodendrítico, além de déficit no transporte axonal. Além disso, a adição de fosfato pode alterar a degradação de TAU, além de ser um fator que potencializa sua agregação (Wang, 2016).

Não se sabe explicar ao certo o motivo da hiperfosforilação desta proteína, porém estudos sugerem que a inflamação, o estresse oxidativo e a excitotoxicidade glutamatérgica são fatores que podem causar alterações na TAU. Essa hiperfosforilação também aumenta a capacidade dessa proteína de se auto agregar, formando oligômeros, fibrilas, pareamentos helicoidais solúveis e emaranhados neurofibrilares (ENF) (Krüger, 2016; Barage, 2015). Apesar destas possíveis conformações, a forma solúvel de TAU é mais tóxica ao organismo do que os ENF, uma vez que estudos já mostraram que houve recuperação da memória de animais mesmo naqueles indivíduos com os ENF (Blennow, 2006). Porém, é inegável que os ENF também possuem efeitos negativos no cérebro, se associando em filamentos helicoidais hiperfosforilados e desestabilizando o citoesqueleto, podendo levar a morte celular.

### 1.2.3. Hipótese amiloidogênica

Desde a descoberta de Alois Alzheimer, um traço marcante da doença foi a presença de depósitos no cérebro de pessoas doentes. Em 1984, Glenner e Wong publicaram um estudo em que sequenciaram um peptídeo torcido em folha-beta ( $\beta$ A) quase que unicamente encontrado nos vasos sanguíneos de pessoas diagnosticadas com DA (amiloidose cerebrovascular), sendo um marcador biológico dessa patologia. Masters e colaboradores (1985) isolaram este mesmo peptídeo retirado do parênquima cortical. Uma vez isolado e sequenciado, seria possível identificar um único precursor do peptídeo  $\beta$ A e proporcionar um diagnóstico específico para a DA.

Para compreender a hipótese amiloidogênica, é necessário conhecer a origem deste peptídeo. Kang (1987) conseguiu identificar o gene responsável pela origem da  $\beta$ A e que este fragmento é originado de uma proteína receptora da superfície celular. A  $\beta$ A é originada da proteólise da Proteína Precursora de Amiloide (PPA). A PPA é uma proteína altamente conservada, que pode ser encontrada no cérebro de diversos animais. Não se sabe ao certo o seu funcionamento, mas ela está associada a importantes processos de desenvolvimento embrionário do cérebro, plasticidade neuronal, formação das sinapses, memória e neuroproteção (Müller, 2017). A PPA é codificada pelo gene PPA (cromossomo 21) que, através do *splicing* alternativo, gera algumas isoformas da PPA. Uma mutação neste gene está relacionada com o aparecimento precoce da DA, devido ao aumento da produção de  $\beta$ A ou a uma alteração na razão das isoformas de  $\beta$ A (Karran, 2016).

A PPA é uma proteína transmembrânica composta por um grande domínio C-terminal extracelular e uma curta cauda N-terminal citoplasmática. Neurônios excitatórios e interneurônios gabaérgicos expressam a PPA, havendo uma alta concentração desta proteína nas regiões do córtex e da formação hipocampal. Ela passa por processos proteolíticos muito complexos, mas que ocorrem naturalmente nas células, sem relacionamento com nenhum tipo de doença (Karran, 2016). Esse processo pode seguir por dois caminhos: a via amiloidogênica e a não-amiloidogênica (Figura 3).

Na via não-amiloidogênica, a PPA é clivada pelas enzimas  $\alpha$ -secretase, que libera um grande domínio extracelular, e pela  $\gamma$ -secretase, que libera o peptídeo p3 para o espaço extracelular e o AICD para o intracelular. Nenhum desses fragmentos são tóxicos ao organismo. Já na via amiloidogênica, a PPA é quebrada pela  $\beta$ -secretase, que também libera uma grande porção para o espaço extracelular, porém diferente do que aquele formado pela  $\alpha$ -secretase. A  $\gamma$ -secretase também atua na via amiloidogênica, porém a sua atuação depois da  $\beta$ -secretase libera o peptídeo AICD intracelular e a  $\beta$ A extracelular. Outras vias catalíticas também atuam na PPA, porém estas são as mais comuns (Vaucher, 2001; Andreeva, 2017).

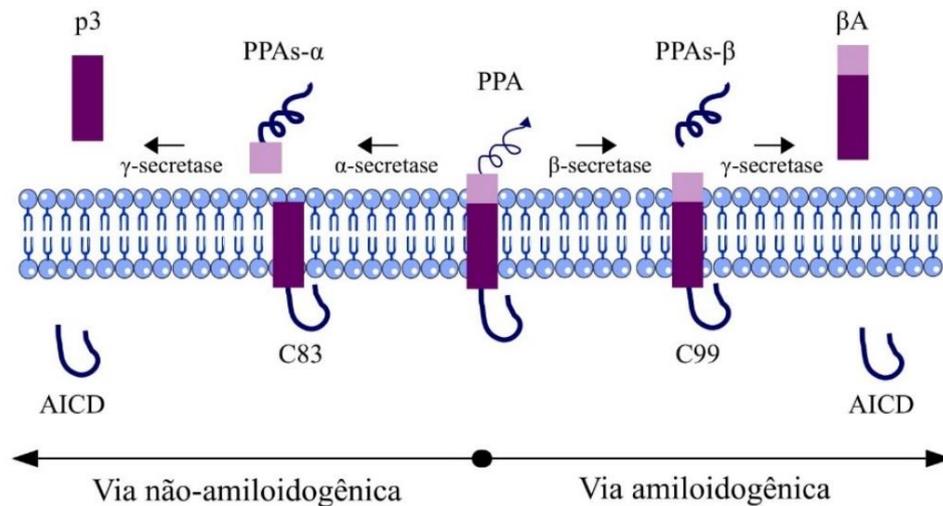


Figura 3: Vias catalíticas da PPA. A atuação da alfa-secretase e da gama-secretase liberam peptídeos que não são nocivos ao cérebro. Já na via amiloidogênica, a atuação da beta-secretase, seguida pela gama-secretase, origina o peptídeo beta-amiloide no meio extracelular (fonte própria).

Como resultado da via amiloidogênica, há a liberação do peptídeo  $\beta$ A no espaço extracelular, porém ele não é uniforme. Ele pode ser formado por 36 a 43 aminoácidos aproximadamente (Querfurth, 2010; Heneka, 2015). No cérebro humano, as duas composições mais encontradas são  $\beta$ A40 e  $\beta$ A42 (Faucher, 2016). Essas diversas isoformas da  $\beta$ A começam a se aglomerar de diversas formas no espaço extracelular. Sua longa cadeia e a presença de aminoácidos hidrofóbicos aumentam a propensão de agregação. (Karran, 2016). São formados monômeros e fibrilas amiloides insolúveis, além de dímeros, trímeros e oligômeros solúveis.

Estudos mostraram que, diferente do esperado, as formas de  $\beta$ A solúveis são muito mais tóxicas ao cérebro do que as insolúveis, porém seu mecanismo de toxicidade ainda não é totalmente elucidado. Deste modo, a severidade da doença vai depender da quantidade de oligômeros formados, e não da quantidade total do peptídeo  $\beta$ A (Querfurth, 2010, Huang, 2012).

Este peptídeo possui um domínio N terminal, composto de aminoácidos hidrofóbicos (17LVF20F). Mudanças nessa sequência podem mudar as propriedades deste peptídeo e sua conformação. A adição do aminoácido prolina, por exemplo, a esta sequência impede a

formação de folhas-beta tão características da  $\beta$ A (Soto, 1998). Esta região entre os aminoácidos 17 e 20 possui vários aminoácidos hidrofóbicos e, a adição ou substituição destes por aminoácidos hidrofílicos impede a agregação da  $\beta$ A, sugerindo que seu processo de agregação ocorre devido a interação destas regiões do peptídeo (Figura 4) (Soto, 1996).

Essa conformação adotada pela  $\beta$ A é importante para a sua agregação. Estudos testaram esse fato através da incubação em diferentes pH, concentração de peptídeo e com a adição de solventes. Algumas dessas condições resultaram na formação de  $\alpha$ -hélice ao invés da tradicional folha- $\beta$ . Isso fez com que os peptídeos em  $\alpha$ -hélice se agregassem de forma muito mais lenta do que aqueles em folha- $\beta$  (Soto, 1996).

A  $\beta$ A é um peptídeo com elevada toxicidade, o que leva os oligômeros de  $\beta$ A iniciarem o processo apoptótico ao se ligarem a receptores de membrana da célula. Além disso, o acúmulo leva a oxidação de ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, dano as organelas e desregulação na entrada de cálcio na célula, reações essas que podem levar a morte celular por diferentes vias. Esse peptídeo também causa danos físicos ao cérebro, induzindo o déficit na plasticidade neural, formação de novos circuitos e cognição. Esses problemas parecem se iniciar antes de haver morte celular no cérebro de pessoas doentes (Canter, 2016).

Estudos indicam que a  $\beta$ A42 é mais tóxica que a  $\beta$ A40. Apesar de suas estruturas só possuírem 2 aminoácidos de diferença, a  $\beta$ A42 tem mais facilidade de se agregar e formar oligômeros pois em sua região C-terminal, há a adição de mais aminoácidos hidrofóbicos. Isso faz com que esses resíduos se tornem mais amiloidogênicos, que são muito tóxicos para o organismo. Em condições fisiológicas normais, a  $\beta$ A40 representa cerca de 90% dos peptídeos formados, e apenas 5% são de  $\beta$ A42 (Sun, 2015). Acredita-se também que a  $\beta$ A40 é metabolizada mais facilmente pelo organismo do que a  $\beta$ A42 (Kocahan, 2017).

1DAEFR 6HDSGY 11EVHHQ **16KLVFF** 21AEDVG 26SNKGA 31IIGLM 36VGGVV 41I42A  
 Região  
 hidrofóbica

Figura 4: Sequência de aminoácidos do peptídeo beta-amiloide 42 e a sua principal região hidrofóbica sendo destacada (fonte própria).

Todos esses processos ocorrem normalmente no cérebro de pessoas saudáveis, uma vez que o organismo possui inúmeros mecanismos para degradar a  $\beta$ A formada e acumulada. Diversas proteases participam desta limpeza, como a neprilina, a enzima degradante de insulina e a enzima conversora de angiotensina (Qiu, 2015; Andreeva, 2017). Porém, na DA,

ocorre uma desregulação da remoção da  $\beta$ A e ela se acumula no cérebro iniciando um processo neuroinflamatório.

Não se sabe ao certo qual o papel da  $\beta$ A no corpo humano, porém existem vários exemplos de que a agregação de proteínas é um processo normal. Quase todos os peptídeos, sob determinadas circunstâncias, conseguem formar agregados e alguns possuem funções específicas. Já foram encontrados agregados funcionais em bactérias, fungos e mamíferos. Esses agregados não são tóxicos ao organismo e possuem uma gama de funcionalidades. Apesar de 90% de similaridade do gene APP dos humanos com outros animais, não foram encontradas, nenhuma das mutações relacionadas com a DA familiar (Andreeva, 2017).

#### 1.2.4. TAU x $\beta$ A

Apesar dos diversos avanços na elucidação da DA, muitos cientistas debatem qual seria o principal fator que leva ao comprometimento cognitivo. As pesquisas focam principalmente na hipótese amiloidogênica e na da proteína TAU, sempre questionando qual surge primeiro.

Analisando separadamente estas hipóteses, principalmente em modelos transgênicos de ratos e camundongos, um dos fatores que os pesquisadores tentam entender é o caminho que estas proteínas percorrem no cérebro (Figura 5). O acúmulo de TAU se inicia no córtex entorrinal, chegando à formação hipocampal e, por fim, se espalhando no córtex cerebral. Já a  $\beta$ A faz o caminho inverso. É certo de que a primeira e principal região do cérebro afetada na DA é da formação hipocampal e o córtex entorrinal. Mas na análise *pós mortem* do cérebro de alguns indivíduos, foi possível ver um grande acúmulo de ENF, sem que a pessoa apresentasse nenhum problema cognitivo. Porém, aqueles que apresentavam acúmulo de  $\beta$ A e TAU, manifestaram sinais típicos da DA. Um dos fatores que pode explicar esse fato é que os ENF não são tão tóxicos aos neurônios, e uma das hipóteses é que sua formação ocorre justamente para que não haja um ataque agudo de monômeros solúveis e tóxicos de TAU (Andreeva, 2017; Wang, 2016; Jucker, 2011).

Consistente com a hipótese amiloide, estudos mostraram que pacientes com DA familiar desenvolvem primeiro aglomerados de  $\beta$ A. Somente depois aparecem agregados de proteína TAU, perda neuronal e demência, comprovando a importância desta teoria para explicar o início da DA (Musiek, 2015). Apesar de a hiperfosforilação da TAU ser mais condizente com a neurodegeneração e dano sináptico, alguns casos clínicos de DA mostram pouco ou nenhum ENF. Além disso, casos de DA somente com placas senis não são

cl clinicamente diferentes daqueles que possuem ambos, ENF e placas senis, apenas possuem uma velocidade de progressão da doença menor (Andreeva, 2017).

Já outros pesquisadores dizem que a hipótese amiloide não está elucidada e que não se sabe ao certo se ela é o fator determinante para o desenvolvimento da DA. Com isso, seria errado classificar pacientes com o acúmulo de placas amiloides, porém sem sinais da doença, no estágio pré-clínico, uma vez que este estágio da doença é caracterizado de acordo com o surgimento da  $\beta$ A. Alguns ainda afirmam que os cientistas adequam os acontecimentos da DA de acordo com a hipótese amiloide já estabelecida, ao invés de alterar a hipótese, e que isto seria muito perigoso para as pesquisas (Herrup, 2015; Musiek, 2015).

Outro fator que pode explicar o padrão de neurodegeneração no cérebro é que os neurônios da formação hipocampal, neurônios colinérgicos, estão em alta concentração e são muito sensíveis ao processo inflamatório, sendo degradados mais rápido do que os da região do córtex. Já sobre neurônios gabaérgicos, agregados de TAU ou  $\beta$ A não possuem efeito. Outro fator agravante na neurodegeneração está relacionado com a composição do citoesqueleto das células hipocampais. Células da região cortical piramidal possuem um citoesqueleto com alta concentração de actina, enquanto que os neurônios da região hipocampal possuem mais microtúbulos.

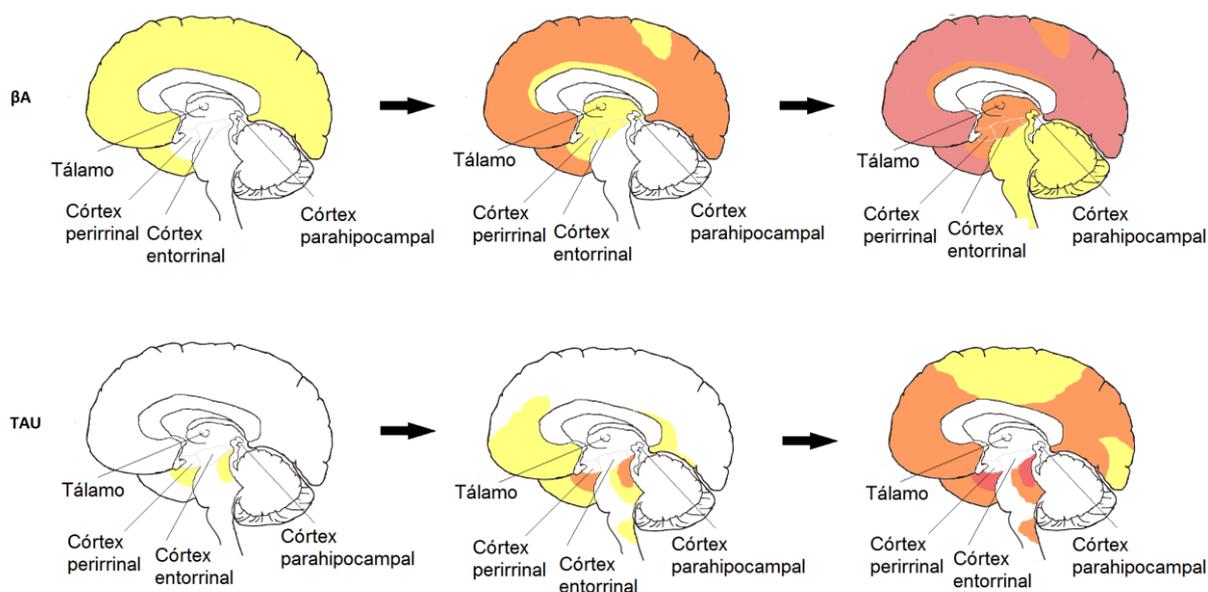


Figura 5: Esquema representativo da propagação da beta-amiloide e da proteína TAU ao longo do desenvolvimento da doença de Alzheimer. A coloração indica as áreas do cérebro afetadas. Em amarelo há dano leve, em laranja moderado e vermelho representa dano grave a região (fonte própria).

Apesar de a discussão para definir se a TAU ou a  $\beta$ A causam prioritariamente a DA, diversos estudos já mostraram que pessoas com formação ENF e oligômeros de TAU não possuíam nenhum tipo de demência. Esse fato também foi comprovado em animais (Krüger, 2016). Também ao analisar amostras histológicas de pacientes com DA, observou-se que o ENF não é suficiente para a neurodegeneração, pois muitas células do córtex cerebral acabam morrendo antes da formação dos ENF.

Um outro fator que faz questionar a atuação da TAU na DA é que, até o momento, nenhuma mutação no gene MAPT está relacionada com a DA (Andreeva, 2017; Wang, 2016). Mutações nesse gene estão relacionadas com o aparecimento de demência frontotemporal (Canter, 2016). Enquanto que na hipótese amiloidogênica, sabe-se de, pelo menos, três genes que estão relacionados com a  $\beta$ A e o aparecimento precoce de sinais da DA. O gene PPA codifica a Proteína Precursora de Amiloide, e uma mutação dominante ou duplicação desse gene está relacionada com a manifestação da doença. Pessoas portadoras da Síndrome de Down possuem três cópias do gene PPA e também desenvolvem sinais da DA. Além dele, outros dois genes, PSEN1 e PSEN2, ligados a via catalítica da PPA, também estão relacionados com a DA precoce. Esses genes codificam os peptídeos Presenilina-1 e Presenilina-2, que compõe a enzima  $\beta$ -secretase e aumentam a formação da  $\beta$ A (Canter, 2016).

É importante ressaltar que ainda não se sabe ao certo qual é o fator determinante da DA, nem se pode listar todos os processos de surgem no decorrer da doença. Mas enquanto isso, é necessário investir e testar diferentes tratamentos que atuam em diferentes processos da DA.

Independente de qual dos dois seja o fator determinante, uma comparação que ocorre com muita frequência é que a DA se espalha no cérebro dos indivíduos de maneira semelhante a príons. Príons são proteínas defeituosas ricas em folhas-beta que induzem o erro de moldagem para outras proteínas. As moléculas que foram corrompidas se tornam pré-dispostas a autoagregação, podendo se tornar prejudiciais aos neurônios. Há ainda evidências de que os príons podem ser transmitidos de um neurônio para outro através de transporte sináptico. Há evidências que esse mecanismo funciona para a  $\beta$ A e *in vitro* para a TAU (Jucker, 2011; Andreeva, 2017).

### **1.3. Fatores de risco**

Diversos fatores de risco já foram enumerados para a DA. Esses fatores podem levar a manifestação da DA de forma precoce ou tardia. A DA familiar possui uma forte influência genética e começa a se manifestar quando o paciente atinge cerca de 30 anos. O fator mais

significativo para o desenvolvimento da DA esporádica é o envelhecimento, sendo 10% de chance para pessoas acima de 65 anos e 50% de chance para pessoas acima de 85 anos. Fatores de risco vascular, como obesidade e altas taxas de colesterol, além de doenças vasculares, como hipertensão e acidentes vasculares encefálicos, estão associadas a um aumento na probabilidade de manifestação da DA esporádica. Fatores psicossociais, como a baixa escolaridade, também estão associados ao risco de desenvolver a DA (Cavanaugh, 2014; Calero, 2015; Kocahan, 2017).

Apesar de estar relacionada a alelos autossômicos dominantes, a DA familiar representa 1% dos casos diagnosticados, enquanto que a DA esporádica abrange os 99% restante. Dentre as alterações genéticas relacionados com a manifestação da DA, três delas estão ligadas ao aparecimento precoce dos sinais da DA, que são o gene da PPA e dois genes relacionados a presenilina (Calero, 2015).

Como descrito anteriormente, a PPA é codificada por um único gene presente no cromossomo 21. Composto por 19 exons, o processo de *splicing* alternativo consegue determinar diversos mRNA para esta proteína. Uma mutação pontual neste gene leva a uma expressão errônea desta proteína, associado aos casos de DA familiar. Porém pessoas portadoras da Síndrome de Down, por possuírem uma trissomia desse gene, possuem uma super expressão desta proteína, apresentando agregados de  $\beta$ A desde muito jovens, mas sem a concomitante presença de ENF.

Pessoas com micro duplicação do cromossomo 21 foram analisadas, como nos casos de Síndrome de Down por translocação. Foi possível perceber que indivíduos que não apresentavam o gene da PPA no cromossomo translocado tinham a Síndrome de Down, porém não desenvolviam DA. Já em casos raros, no qual ocorre uma microduplicação somente do gene PPA (e não de todo o cromossomo 21), o indivíduo desenvolvia DA, porém não possuía Síndrome de Down. Isso comprova que o gene da PPA está diretamente relacionado com a doença (Selkoe, 2016).

A mutação relacionada a DA familiar faz com que haja uma alteração no sítio de clivagem das enzimas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  secretase, alterando a atuação dessas enzimas (Yamada, 2000). Um estudo de grande relevância foi o realizado por Jonsson (2012). Ele mostrou que uma mutação na APP resulta em diminuição da sua clivagem pela  $\beta$ -secretase e indivíduos com esse tipo de alteração não apresentavam formação de placas senis e nem declínio cognitivo típico da DA. Esses fatores corroboram com a hipótese amiloidogênica.

Outro gene que está relacionado com a DA é o codificante da proteína ApoE. Pesando 34kDa, essa glicoproteína está relacionada com o armazenamento, transporte e metabolismo do colesterol, sendo produzida e secretada no SNC pelos astrócitos. Porém, quando liberada

no espaço extracelular, ela se liga aos ENF e as placas senis. O gene ApoE está localizado no cromossomo 19 e os alelos ApoE 2, ApoE3 e ApoE4 são as três isoformas mais encontradas dessa proteína, mas a frequência do alelo ApoE4 é significativamente maior em casos de DA esporádica (Karran, 2016; Calero, 2015; Yamada, 2000). Embora este alelo aumente a chance de desenvolvimento da doença, ele não é necessário nem suficiente para explicar o desenvolvimento da DA (Cavanaugh, 2014). Aproximadamente 20-25% da população carrega uma cópia do alelo ApoE4, e 2% carregam duas cópias.

Não se sabe ao certo a função desta glicoproteína no cérebro, mas estudos mostraram que ela está envolvida no transporte do colesterol e outros lipídeos. Ela também está ligada ao metabolismo da  $\beta$ A. ApoE4 promove a deposição e agregação da  $\beta$ A, enquanto que pessoas com o alelo ApoE2 possuem menos chance de desenvolver a DA (Calero, 2015). Estudos também mostraram que indivíduos portadores do alelo ApoE4 e que concomitantemente possuem infecção do vírus da herpes simples tipo 1, tem maior chance de desenvolver a DA. Este vírus ativa o catabolismo da APP pela via amiloidogênica e que o alelo desta glicoproteína potencializa a aglomeração de  $\beta$ A (McManus, 2017).

TREM2 é um tipo de proteína transmembrana que é expressa em osteoclastos, macrófagos e também age como receptor na micróglia. Em duplicação, uma mutação que causa a perda da função de TREM2 está ligada a doença de de Nasu Hakola, que é caracterizada por demência. Este ativador de micróglia se liga a diversos tipos de ligantes, como bactérias e fosfolipídeos. Uma teoria é que o alelo inativador de TREM2 impede a ativação da micróglia para fagocitar os depósitos de  $\beta$ A (Strooper, 2016; Selkoe, 2016).

Os casos de DA precoce estão em sua maioria relacionados a uma alteração nas proteínas presenilinas PS1 e PS2, com seus genes localizados nos cromossomos 14 e 1, respectivamente. Mas de 50 mutações para o gene PS1 já foram reportadas (Yamada, 2000). Investigando o complexo da  $\gamma$ -secretase na progressão da DA, pesquisas descobriram que a presenilina é importante para a estabilidade desta enzima e que os genes da presenilina codificam o sítio ativo da enzima  $\gamma$ -secretase. Em ambos os genes, as mutações alteram a taxa de clivagem da APP, tendo como produto peptídeos maiores, mais hidrofóbicos e com maior chance de agregação, como a  $\beta$ A42 (Kuruva, 2016; Selkoe, 2016). Porém estudos recentes analisaram as mutações conhecidas da PS1 e concluiu-se que 75% das mutações analisadas tem como efeito a diminuição da produção de  $\beta$ A, sendo algumas delas responsáveis por uma diminuição significativa do nível deste peptídeo (Kuruva, 2016; Sun, 2017).

#### 1.4. Neuroinflamação e neurodegeneração

Uma vez acumulada no espaço extracelular, a  $\beta$ A começa a se aglomerar em diferentes formas. Essa agregação ocorre, pois a  $\beta$ A é instável na forma de monômero. Além disso há indução do meio, fazendo com que a  $\beta$ A se ligue com a AchE (Karran, 2016, Qiu, 2015). Isso pode levar a efeitos tóxicos, como estresse oxidativo, excitotoxicidade, neuroinflamação, aumento da permeabilidade da membrana, mudança no citoesqueleto e ativação de vias apoptóticas.

A neurodegeneração se caracteriza por mudanças na expressão de neurotransmissores, número reduzido de neutrófilos, dano sináptico, acúmulo de  $\beta$ A, além da morte neuronal em larga escala e atrofia neural nos estágios finais da doença (Kocahan, 2017).

Uma das primeiras consequências do acúmulo dos oligômeros de  $\beta$ A e dos ENFs de TAU é o início da atividade inflamatória da micróglia. A sua ativação é acompanhada de uma elevada produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. A reação inflamatória se torna tão severa que passa a afetar os neurônios, sua estrutura e sobrevivência. Sabe-se também que a ativação dessa célula ocorre muito antes da manifestação dos primeiros sinais (Spangenberg, 2016; Minter, 2016).

A micróglia é uma célula da glia responsável pela atividade fagocítica no SNC, atuando de forma semelhante a um macrófago. Ela também é responsável pela sustentação dos neurônios, formação de sinapses e pela plasticidade neural (Dansokho, 2017; Minter, 2016). A origem da micróglia difere das outras células da glia, pois ela é formada a partir de células no saco vitelínico que migram para o cérebro antes da formação da barreira hematoencefálica. Desta forma, a micróglia se autorrenova constantemente para manter o número de células durante toda a vida, sem depender das células da medula óssea (Bolós, 2017).

Durante a manutenção da homeostase no cérebro, a micróglia apresenta o estado de repouso e o estado ativo. A mudança desses estados ocorre a partir da ativação da micróglia e liberação de citocinas e lipopolissacarídeos. A forma ativa da micróglia ainda pode ser classificada em M1 (inflamatória) e M2 (neuroproteção), mas acredita-se que as células alternem entre esses estados (Figura 6). As células em M1 predominam no local da injúria, enquanto que M2 aparece depois, mais relacionada com o processo de reparo (Bolós, 2017; Minter, 2016).

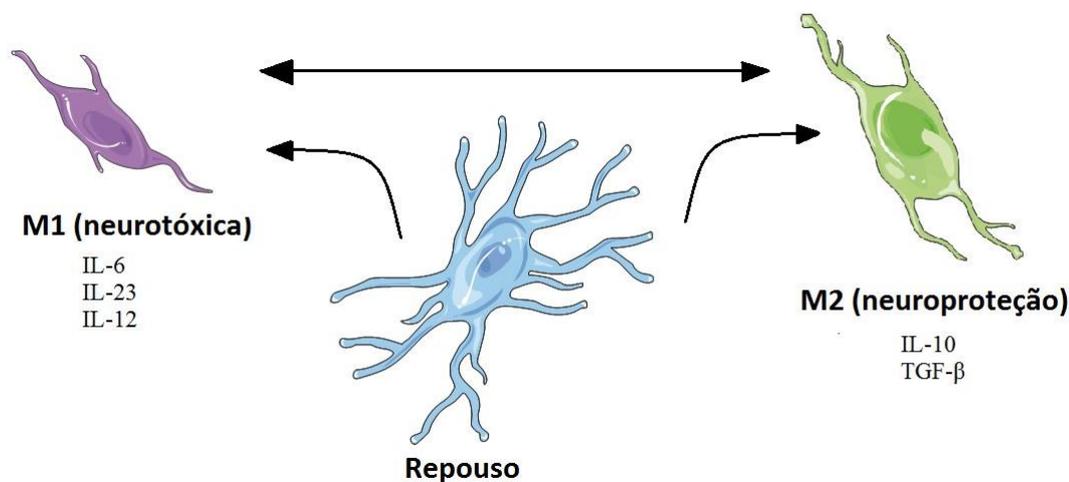


Figura 6: Esquema representativo da ativação da micróglia, podendo alterar seu estado para M1 ou M2. Cada estado ativado libera substâncias diferentes e possuem funções diferentes no cérebro (fonte própria).

Nos estágios iniciais da doença, a produção de citocinas pró-inflamatórias tem como objetivo otimizar a retirada dos oligômeros de  $\beta$ A do cérebro, sendo efetiva na limpeza e manutenção da homeostase. Porém, com o desenvolvimento da DA, a micróglia se torna ineficaz nesta limpeza. O aumento na concentração destes peptídeos estimula mais ativação de micróglia, que libera mais citocinas e fator de necrose tumoral, intensificando o processo inflamatório (Bagyinszky, 2017; Spangenberg, 2016). Através da análise do cérebro de pacientes com tomografia de emissão de pósitrons (PET), foi possível verificar que a ativação e o processo inflamatório no cérebro começam antes da manifestação dos sinais da DA (Spangenberg, 2016).

A ativação da micróglia induz a uma resposta imune inata, marcada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias e fatores quimiotáticos. Estes fatores ajudam na entrada de leucócitos circulantes no CNS. Porém, com a progressão da doença, a atividade fagocítica da micróglia fica cada vez mais ineficiente, e a liberação de citocinas cada vez mais intensa, fator que agrava o processo inflamatório no cérebro de pessoas com DA (Zenaro, 2017).

O acúmulo de  $\beta$ A também estimula a ativação de astrócitos. Estas são as células mais abundantes no SNC, ajudando na manutenção da barreira hematoencefálica (BHE), do controle iônico e da distribuição de nutrientes para os neurônios. Porém, uma vez ativado, ele também sustenta o processo inflamatório, com a produção de citocinas (IL-1B e IL6) e com estresse oxidativo (Bagyinszky, 2017; Zenaro, 2017).

Astrócitos estão ao redor de grande parte da BHE, se conectando as células endoteliais. Estes mesmos astrócitos também se comunicam diretamente com os neurônios,

fazendo com que tenha uma comunicação entre essas duas células. Essa comunicação entre os astrócitos e as células endoteliais permite que ele consiga regular muitas características da BHE e, conseqüentemente, alterar sua permeabilidade. A ação destas células da glia pode tornar as junções entre as células mais rígidas (barreira física), alterar a expressão e localização de proteínas transmembrânicas que atuam como canais (barreira de transporte) e a atuação de um sistema enzimático especializado (barreira metabólica) (Zenaro, 2017).

TAU também pode participar da ativação da micróglia e de astrócitos, porém os ENFs não são a forma que mais os ativa, mas sim oligômeros de TAU. Células M1 são facilmente encontradas próximas aos emaranhados neurofibrilares, fato que se justifica pela atividade fagocítica da micróglia. Porém, este mecanismo de proteção pode influenciar no alastramento da doença para outras regiões do cérebro (Bagyinszky, 2017; Krüger, 2016). Na Figura 6 está um esquema representativo da ativação da micróglia, podendo alterar seu estado para M1 ou M2. Cada estado ativado libera substâncias diferentes e possuem funções diferentes no cérebro.

Além disso, dentro da micróglia ocorre a ativação da enzima COX-1 que estimula a liberação de mediadores inflamatórios. Recentemente, cientistas verificaram que a ativação ocorre pela ligação da  $\beta$ A extracelular com a PPA da membrana da micróglia, atribuindo mais uma função para a PPA (Bolós, 2017).

Com o desenvolvimento da doença, mais  $\beta$ A e TAU se acumulam no cérebro e mais micróglia é ativada com o objetivo de tentar fagocitar esses peptídeos. Porém, esse processo se torna ineficiente. Sabe-se que a  $\beta$ A e Tau estimulam um processo inflamatório crônico. As placas senis e os emaranhados neurofibrilares ficam cercados de micróglia ativada e astrócitos reativos, eles servem como uma fonte contínua de produtos da neuroinflamação, que ativam mais células, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias, entrando em um loop de reforço positivo (Niranjan, 2013).

Com isso, além de não conseguir diminuir a quantidade de  $\beta$ A, a micróglia ativada libera no cérebro vários fatores neurotóxicos, tais como fator de necrose tumoral, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, que levam ao processo de neurodegeneração. Com o agravamento da doença, o processo inflamatório começa a se retroalimentar, de forma que mesmo que se retirasse a  $\beta$ A, ele continuaria.

### **1.5. Excitotoxicidade glutamatérgica, estresse oxidativo e cascata apoptótica**

Além da neuroinflamação, um outro processo importante que ocorre em pacientes com DA é a excitotoxicidade glutamatérgica. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e possui um papel fundamental na plasticidade neural e formação de memória (Mehta, 2013).

Os neurônios pós-sinápticos possuem dois tipos de receptores para o glutamato: metabotrópicos e ionotrópicos. Receptores ionotrópicos são aqueles que funcionam como canais e, ao se abrirem, permitem a passagem de íons pela membrana plasmática da célula de forma rápida. Já os receptores metabotrópicos também podem abrir canais iônicos, mas de forma diferente. Uma vez ativado, o receptor metabotrópico ativa a proteína G, que atua como segundo mensageiro, gerando uma resposta celular como, por exemplo, a abertura de um canal iônico. Existem 8 tipos de receptores metabotrópicos, que são divididos em 3 grupos: grupo 1 (mGlu 1 e 5), grupo 2 (mGlu 2 e 3) e grupo 3 (mGlu 4, 6, 7 e 8) (Revet, 2013).

A presença de  $\beta$ A e TAU desregulam a sinapse glutamatérgica. Estudos mostraram que a presença destas proteínas aumenta a concentração de glutamato na sinapse, além de eles conseguirem interagir com o receptor NMDA e ativá-lo. Esse processo leva a um influxo de cálcio intensificado em relação ao que normalmente ocorre. Uma vez no citoplasma, o excesso de cálcio passa a inibir enzimas que participam da respiração celular. A inibição da atividade mitocondrial leva a liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e óxido nítrico, se somando aos que são produzidos pela micróglia. Um outro efeito que ocorre na mitocôndria é a formação de um poro e liberação do citocromo C (Kamat, 2016; Mehta, 2013).

O dano mitocondrial é acoplado ao estresse oxidativo. O estresse ocorre por diversos fatores. Os radicais livres podem ser resultantes dos processos inflamatórios que estão ocorrendo no cérebro devido ao acúmulo de  $\beta$ A, ou podem ser formados durante o metabolismo oxidativo normal (Niranjan, 2013). Uma vez acumulados no meio intracelular, os radicais livres começam a oxidação de proteínas e lipídeos, modificando a sua estrutura. Essas alterações comprometem as vias antioxidantes da célula.

Estudos mostram que os radicais livres no citoplasma também oxidam DNA e RNA, que danificam o funcionamento do núcleo, mitocôndria e outras organelas da célula. A  $\beta$ A possui um aminoácido que é facilmente oxidado. Com o acúmulo de  $\beta$ A, mais ela será oxidada, liberando radicais livres e intensificando os sinais da doença (Butterfield, 2013). Outro fator que agrava a DA é que o estresse oxidativo aumenta a atividade da enzima  $\beta$ -secretase, levando ao aumento da produção de  $\beta$ A (Niranjan, 2013).

Com o processo inflamatório iniciado pela micróglia e a excitotoxicidade glutamatérgica nos neurônios, a quantidade de radicais livres se torna muito grande e eles

passam a danificar diversas estruturas da célula. A oxidação de ácidos nucleicos, lipídeos da membrana plasmática e de organelas membranosas são tão extremos que a célula inicia o processo de necrose (Kamat, 2016; Mehta, 2013).

A morte celular também ocorre por ativação da via das caspases. Esse grupo de proteínas estão relacionadas com o processo apoptótico. Apoptose e necrose são dois processos em que há a morte celular, porém eles possuem vias diferentes. Quando a morte celular ocorre de forma programada, a chamamos de apoptose. Quando a morte celular ocorre por disfunção energética, influxo de cálcio e dano a membrana plasmática, a classificamos como necrose. Outra diferença é que após a necrose, ocorre a liberação de componentes citoplasmáticos no meio extracelular, já na apoptose tudo é degradado (Dias, 2014).

As caspases podem se iniciadoras (caspase 8, 9 e 10) ou efetoras (caspase 3, 6 e 7), sendo bem conhecida a sua função no processo apoptótico (Burguillos, 2011). Como dito anteriormente, a excitotoxicidade glutamatérgica gera o influxo abundante de cálcio. Este íon inativa a função mitocondrial e causa a liberação de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, levando ao estresse oxidativo. Também ocorre a liberação do citocromo C, proteína existente na membrana interna das mitocôndrias e que participam da etapa final do processo de respiração celular. A liberação do citocromo C no citoplasma ativa a Caspase 9, que ativa a Caspase 3. Para a efetivação do processo apoptótico, a Caspase 3 produz e libera diversos mediadores pró-inflamatórios, como a IL 1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e ON. Também há atuação da Caspase 1 no processo inflamatório, pois ela é necessária para a ativação das interleucinas IL 1 $\beta$  e 18, que foram produzidas pela micróglia e astrócitos (Heneka, 2015; Dias 2014).

Recentemente, pesquisas comprovaram que a  $\beta$ A também é capaz de induzir o processo apoptótico. Uma vez internalizados pelos neurônios, a  $\beta$ A pode causar a ativação o fator de transcrição 4. Esse fator inicia a transcrição e tradução de uma série de genes pró apoptóticos e leva a degradação celular (Nisbet, 2015).

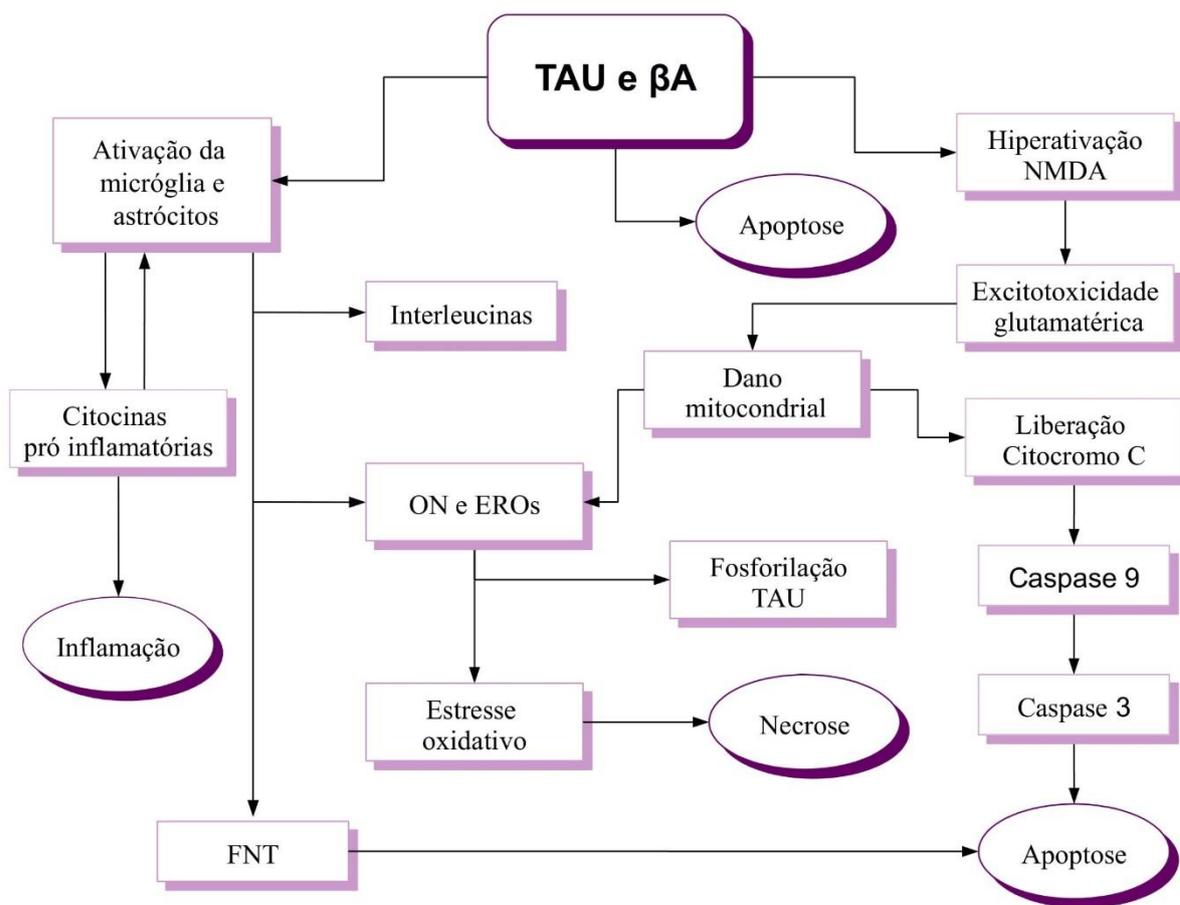


Figura 7: Esquema representativo dos processos que ocorrem na célula após o acúmulo de beta-amilóide e TAU. Diferentes reações se iniciam no cérebro, como a ativação da micróglia e astrócitos, que produzem citocinas pró-inflamatórias, interleucinas, óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio e fator de necrose tumoral, que podem levar a morte celular, além de retroalimentar a fosforilação de TAU. Outra via é iniciada com a hiperativação do receptor NMDA, que resulta na excitotoxicidade glutamatérgica. Isso intensifica o estresse oxidativo, levando a necrose e inicia a cascata apoptótica (fonte própria).

## 1.6. Tratamento

A busca de medicamentos para a DA é intensa, porém poucos possuem resultados eficientes. Os fármacos já presentes no mercado para a DA são: donezepil, rivastigmina, galantamina, tacrina e memantina. Todos estes fármacos possuem apenas a função de retardar o avanço da doença e atenuar os sintomas. Atualmente não há nenhum medicamento que consiga parar ou reverter os danos da DA (Canter, 2016).

Os quatro primeiros fármacos citados atuam na via colinérgica, sendo inibidores da acetilcolinesterase, buscando aumentar a concentração de acetilcolina no espaço sináptico e estimular a transmissão nervosa. Como apresentado anteriormente, a via colinérgica é importante para a formação da memória e foi a primeira hipótese criada para tentar explicar o surgimento da DA. Porém, como não impedem a progressão da doença, esses fármacos só são eficientes por um curto período, no qual ele ameniza a manifestação dos sinais da DA em que há a diminuição do fornecimento de ACh nas sinapses.

O primeiro fármaco comercial para o tratamento foi a tacrina, aprovada em 1993. Ela atua na inibição da AchE. Porém, devido a sua elevada toxicidade hepática e muitos efeitos adversos, ela passou a ser utilizada em último caso, quando o paciente não responde aos demais tratamentos. Donezepil e a rivastigmina atuam de forma semelhante a tacrina, porém possuem efeitos muito menos tóxicos. A galantamina atua como agonista de receptores nicotínicos pré-sináptico, estimulando a liberação de mais ACh e inibindo a AChE. A AChE é a enzima com maior eficiência catalítica, por isso ela se tornou o alvo de tantos fármacos. Quando os inibidores de AchE não são mais suficientes para retardar a doença, uma alternativa encontrada no mercado é a memantina (Canter, 2016; Dias 2015; Ventura, 2009).

Sabe-se que há uma hiperativação dos receptores NMDA ao longo da progressão da doença, e que isso leva a um influxo excessivo de íons de cálcio para o meio intracelular. O cálcio desregula a homeostase e pode levar a morte celular. Este medicamento atua como um antagonista do receptor NMDA e retarda a desregulação e morte celular (Kumar, 2016).

Por ser uma doença extremamente complexa e com alguns processos que ainda não foram totalmente elucidados, uma alternativa para o tratamento da DA é uma estratégia terapêutica chamada polifarmacologia, na qual há a combinação de vários fármacos em uma única formulação ou o uso de coquetéis medicamentosos. Essa técnica já é utilizada para o tratamento de algumas doenças como câncer e tuberculose. Como forma de minimizar os custos, as pesquisas para novos fármacos buscam combinar em uma única molécula que atue em vários alvos de forma simultânea (Dias, 2014)

Diante de todos os processos que ocorrem durante a DA, várias são as alternativas de alvos farmacológicos. Muitas pesquisas focam em três principais alvos: PPA,  $\beta$ -secretase e a  $\beta$ A. Pesquisas com a  $\beta$ -secretase não conseguem obter resultados eficientes por dificuldade dos medicamentos passarem a barreira hematoencefálica e problemas na especificação do alvo farmacológico, além de estudos sem testes cognitivos ou sem a comparação da concentração de  $\beta$ A após o tratamento (Canter, 2016). Alguns medicamentos conseguiram obter mais sucesso através da inibição desta enzima e estão em fase de teste: AZD3293 (fases II/III), MK-8931 (fases II/III), E2609 (fases II/III), e HPP854 (fase I) (Kuruva, 2016).

Inibidores da  $\gamma$  secretase foram muito estudados nos últimos anos. Eles podem ser divididos de acordo com o local em que se ligam a enzima: sítio ativo da enzima, ancoragem de substrato ao sítio de ligação e ligante alternativo para a enzima. Porém, muitos medicamentos na sua fase de teste foram descartados por não passarem a barreira hematoencefálica ou por causarem efeitos adversos (Kuruva, 2016; Dias 2014).

Alguns estudos mostraram que o uso de anti-inflamatórios não-esteroidais inibem a enzima COX no cérebro e diminuem o processo inflamatório, mas esses medicamentos não

são suficientes para o tratamento da DA. Entretanto, alguns outros fármacos têm como alvo receptores de micróglia, do tipo-toll ou de reconhecimento de padrões. Estes medicamentos, em fase de teste, conseguem atuar diretamente nas células produtoras de mediadores pró-inflamatórios e diminuir a inflamação (Dansokho, 2017).

GSK3 e CDK5 são proteínas que regulam a fosforilação de proteínas, como a TAU, e podem ser uma boa fonte de novos fármacos. A GSK 3 atua como regulador da fosforilação dos aminoácidos serina e treonina. Já CDK5 são enzimas que atuam no desenvolvimento do SNC e consolidação da memória. Quando as células são expostas a um estímulo patológico, essas enzimas ficam hiperativadas, causando hiperfosforilação anormal de proteínas, como a proteína TAU. Portanto, a sua inibição pode ser uma boa opção de alvo farmacológico para tratamento da TAU (Kuruva, 2016).

Atualmente, uma alternativa que está mostrando resultados promissores é a imunização contra a  $\beta$ A. Porém, esses resultados só estão sendo verificados em pessoas com DA em estágio inicial e nenhum para fases mais avançadas (Kumar, 2016).

A memantina é o único medicamento que atua como antagonista de NMDA, com isso, várias pesquisas buscam outras moléculas que tenham a mesma atuação e que sejam mais eficientes (Kumar, 2016). Além de diminuir a ativação de receptores glutamatérgicos, a memantina mostrou diminuir a fosforilação da TAU (Andreeva, 2017).

Outros medicamentos visam a TAU como alvo ou a estimulação cerebral direta, que é uma metodologia não invasiva como o objetivo de aumentar o número de terminais dendríticos, induzindo a plasticidade neural e reparando circuitos neuronais e reestabelecendo a memória de pacientes (Canter, 2016).

Os monômeros de  $\beta$ A são menos tóxicos ao organismo do que os agregados que formam as placas senis. Por isso, uma possibilidade de medicamento seria um que evitasse a agregação deste peptídeo. A região hidrofóbica é utilizada como guia para agregação e, uma possibilidade de fármaco é um que impeça essa união. Algumas proteínas já foram testadas para inibir essa agregação, como a A $\beta$ 5. Esta mostrou uma diminuição da agregação da  $\beta$ A em folhas- $\beta$ , tanto na  $\beta$ A40 quanto na  $\beta$ A42. Já na atuação em fragmentos de  $\beta$ A, como  $\beta$ A17-21,  $\beta$ A1-16,  $\beta$ A 17-22 não houve efeito (Soto, 1998). Já Austen (2008) projetou peptídeos que se ligam a região hidrofóbica da  $\beta$ A, porém também testando uma sequência em que diminuísse a probabilidade deste peptídeo se autoagregar. OR1 e OR2 foram testados e OR1 mostrou maior tendência de agregação. Já OR2 conseguiu diminuir o número de agregações de  $\beta$ A40.

Uma outra opção de tratamento são fármacos que visam diminuir o processo inflamatório. Pesquisas revelaram que medicamentos anti-inflamatórios não-esteroides contribuem retardando a progressão da DA, embora não sejam suficientes para impedir completamente a progressão (Vlad et al., 2008). Com tudo isso, é importante perceber que os atuais medicamentos não contemplam as pessoas que já estão com a DA em estágio avançado, e que neste estágio da doença, uma das possibilidades é acabar ou diminuir a neuroinflamação. Peptídeos presentes na peçonha de animais e seus análogos sintéticos são muito visados como uma nova fonte de fármacos, uma vez que esses peptídeos possuem grande afinidade com o SNC, sendo uma esperança para desordens neurodegenerativas (Silva, 2015)

Recentemente, o nosso grupo do Laboratório de Neurofarmacologia isolou alguns peptídeos da peçonha da vespa *Parachartegus fraternus*. Dentre eles, a fraternina, assim chamada pelo grupo, composta por 24 resíduos de aminoácidos, totalizando 2748 Da. Ela apresentou efeito neuroprotetor dose-dependente e evitou a neurodegeneração de células da via nigroestriatal, após a indução da doença de Parkinson em camundongos Swiss (Biolchi, 2013). Neste modelo, a doença de Parkinson foi induzida pela administração de 6-hidroxdopamina (40 µg/animal) via intraestriatal, recebendo tratamento 1h, 72h e 120h via intracerebroventricular após a neurocirurgia. Nesta condição, a fraternina apresenta alto potencial com modelo para desordens neurodegenerativas, já que mostrou uma diminuição da resposta inflamatória.

Para o desenvolvimento de um fármaco pequeno, de menor custo, mas que ainda mantenha a ação neuroprotetora, a estrutura química da fraternina foi modificada e foi sintetizado um peptídeo análogo, denominado fraternina-10, que apresenta somente 10 resíduos de aminoácidos e 1204,49 Da. A fraternina-10 foi testada com o mesmo protocolo citado anteriormente para a doença de Parkinson e a dose de 4,1nmol teve diferença significativa em relação aos animais doentes nos testes de latência de queda do rotarod (Biolchi, 2018).

A cascata inflamatória que ocorre na Doença de Parkinson apresenta, em partes, mecanismos análogos aos apresentados na DA, como a ativação de micróglia e astrócitos, liberação de mediadores pró-inflamatórios, excitotoxicidade glutamatérgica, desregulação do cálcio intracelular, dano mitocondrial e ativação da cascata apoptótica. Portanto espera-se que estes peptídeos também apresentem resultados significativos neste estudo.

Um outro peptídeo foi isolado da vespa *Polybia occidentalis*. A peçonha desnaturada de insetos deste gênero apresentou atividade antiepiléptica em modelos de epilepsia induzida por ácido caínico, picotroxina e bicuculina, além de crises provocadas por antagonistas

gabaérgicos (Siqueira, 2005; Couto 2012). A Occidentalina-1202 foi isolada da vespa *P. occidentalis*, com massa molecular de 1202 Da e 9 resíduos de aminoácidos. Esse peptídeo apresentou um efeito potente contra convulsões por crises induzidas por agonistas glutamatérgicos e antagonistas gabaérgicos (Mortari, 2007). A partir dela foi desenvolvido um peptídeo, denominado Neurovespina. Além de possuir efeito anticonvulsivante 6 vezes mais potente, este peptídeo também apresentou efeito neuroprotetor em crises epiléticas e na Doença de Parkinson (Carneiros, 2013; Campos 2016).

A seleção de um peptídeo do banco de dados do Laboratório de Neurofarmacologia da UnB buscou um composto que tivesse a capacidade de inibir a agregação da  $\beta$ A. Sua sequência básica possui aminoácidos hidrofóbicos que tendem a interagir com a região também hidrofóbica da  $\beta$ A (Figura 4). Ele foi modificado a partir da sequência da Occidentalina-1202, substituindo alguns aminoácidos para tornar o peptídeo mais hidrofóbico. Este novo peptídeo foi chamado de octovespina. Camargo (2017) testou este peptídeo em um modelo murino da DA através da indução pelo peptídeo beta-amiloide, e obteve resultados significativos na melhora cognitiva dos animais através dos testes de reconhecimento de objeto novo e do labirinto aquático de Morris. Porém a administração dele foi via intracerebroventricular o que o torna inapropriado para a comercialização. Buscando uma melhor via de administração, a octovespina foi testada via subcutânea no presente trabalho.

A peçonha de artrópodes é rica em componentes biologicamente ativos e com diversos alvos moleculares, tendo uma afinidade grande pelo SNC sendo, portanto, uma fonte de novos fármacos para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos (Monge-Fuentes, 2015; Mortari, 2007).

Sendo assim, o principal objetivo do presente trabalho é avaliar o efeito anti agregação dos peptídeos fraternina-10 e octovespina, em um modelo murino que mimetiza a DA, através da injeção tratamento via subcutânea.

## 2. Objetivos

Este projeto busca avaliar a ação antiamiloidogênica dos peptídeos sintéticos fraternina-10 e octovespina em um modelo murino da DA induzida pela aglomeração de  $\beta$ -amiloide.

### 2.1. Objetivos específicos

- Verificar a capacidade de os peptídeos fraternina-10 e octovespina em ultrapassarem a barreira hematoencefálica, através da administração do tratamento via subcutânea.
- Testar a ação antiamiloidogênica da fraternina-10 e da octovespina no modelo murino da DA induzido pela injeção do peptídeo  $\beta$ -amiloide
- Verificar o efeito do tratamento com os peptídeos na redução dos déficits cognitivos induzidos pela  $\beta$ A em modelos comportamentais de aprendizado e memória: campo aberto, reconhecimento de objeto e labirinto aquático de Morris.
- Verificar a agregação do peptídeo  $\beta$ A no cérebro dos camundongos através de análise histológica, utilizando a marcação com Tioflavina.

### 3. Material e métodos

#### 3.1. Animais

Para avaliar a ação antiagregação da  $\beta$ A da fraternina-10 e da octovespina foram utilizados camundongos *Swiss* machos, entre 5 e 6 semanas de idade, com peso entre 20 e 30g aproximadamente. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnB), acomodados em estufas isoladas com temperatura (25°C) e umidade (55%) controladas, ciclo claro/escuro de 12 horas cada, além de água e comida *ad libitum*.

O procedimento com animais foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA/ IB) da UnB, e seguiu os Princípios Éticos na Experimentação Animal (CONCEA) e a Lei Arouca (Lei 11794) (Anexo 1).

#### 3.2. Protocolo experimental

Para a indução do déficit cognitivo nos animais foi utilizada a  $\beta$ A (Sigma-Aldrich®, EUA) diluída em PBS, injetada através de cânula guia no ventrículo lateral direito. O peptídeo foi previamente incubado por 4 dias a 37°C para a formação dos agregados. Cada alíquota de  $\beta$ A continha 100 microgramas do peptídeo e estava armazenada a -80°C a seco. No dia da incubação, a  $\beta$ A era ressuspendida com 76,5  $\mu$ L de solução PBS. Depois do período de incubação, foi realizada a neurocirurgia. A partir de estudos realizados previamente no laboratório de Neurofarmacologia, essas condições são suficientes para induzir o déficit cognitivo nos animais através da agregação parcial da  $\beta$ A.

No dia da cirurgia, os animais foram anestesiados com uma solução de quetamina (Dopalen Ceva®, 75 mg.kg<sup>-1</sup>) e xilazina (Anasedan Ceva®, 15 mg/kg), por via intraperitoneal. Quando anestesiados, foram colocados em um esterotáxico (Insight Equipamentos®) para realização da neurocirurgia. O local onde foi feita a incisão foi limpo previamente com iodopolvidona e, em seguida, injetado localmente o cloridrato de lidocaína a 30 mg/mL com hemitartrato de norepinefrina a 0,04 mg/mL (Lidostesim® 3%) para uma anestesia e vasoconstrição local.

Para a inserção da cânula guia, o crânio foi exposto e tirada as medidas necessárias para a localização do ventrículo lateral direito a partir do bregma: ântero-posterior: -0,2 mm; meso-lateral: -1,0 mm; dorso-ventral: -2,3 mm, de acordo com o Atlas de Franklin & Paxinos (1997) (Figura 8). Para a injeção da  $\beta$ A, foi utilizada uma bomba de infusão (Harvard



Durante a realização dos ensaios comportamentais, havia ao menos um animal pertencente ao grupo *sham*, um animal do grupo doente e um animal que recebeu o tratamento com um dos peptídeos.

Todos os ensaios comportamentais foram gravados (Intelbras HDCVI 3004, câmera VHD 3030B) e posteriormente analisados no software Anymaze (Stoelting Co®, Reino Unido) e serão explicados com mais detalhes a seguir.

Com a finalização dos ensaios comportamentais, os animais foram perfundidos para a retirada do cérebro e posterior análise histológica. Cada camundongo teve seu cérebro armazenado, fatiado e a partir desses cortes, foram feitas técnicas de marcação com Tioflavina T e DAPI para a contagem de agregados de  $\beta$ A e de núcleo de neurônios, respectivamente. As amostras foram comparadas para análise dos resultados.

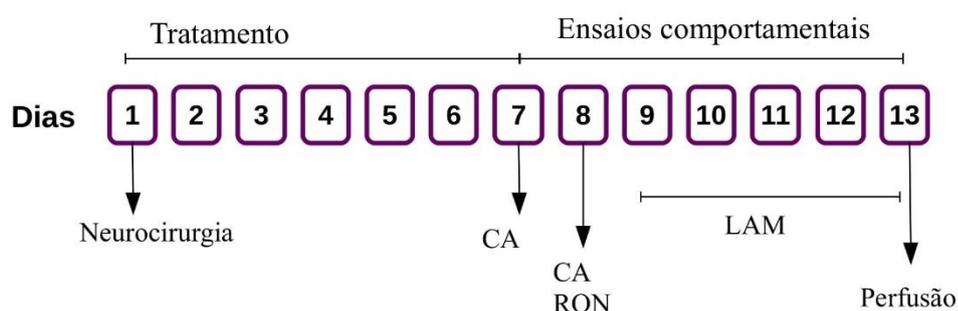


Figura 9: Esquema representativo do cronograma utilizado neste estudo. O tratamento se inicia no dia 1, logo após a neurocirurgia, e segue até o dia 7. Após a administração da última dose, começam os ensaios comportamentais: campo aberto (CA), reconhecimento de objeto novo (RON) e finalizando com o labirinto aquático de Morris (LAM). Ao final dos ensaios comportamentais, os animais são perfundidos para posterior análise histológica (fonte própria).

### 3.2.1. Grupos experimentais

Os animais que fizeram parte dos ensaios comportamentais foram divididos em 8 grupos:

Grupo	Neurocirurgia	Tratamento	Nº de animais
Naive	-	-	5
<i>Sham</i>	PBS	Salina	10
$\beta$ A40	$\beta$ A40	Salina	7
$\beta$ A42	$\beta$ A42	Salina	5
Fraternina-10	$\beta$ A40	Fraternina-10 4 mg/kg	7
Fraternina-10	$\beta$ A42	Fraternina-10 8 mg/kg	9
Fraternina-10	$\beta$ A42	Fraternina-10 12 mg/kg	8
Octovespina	$\beta$ A42	Octovespina 4 mg/kg	10

Não houve diferenças significativas nas análises dos grupos naive e *sham*, portanto o grupo naive foi retirado das análises. Também não houve diferença entre os animais que receberam a  $\beta$ A40 e a  $\beta$ A42. Apesar de a  $\beta$ A42 ser considerada mais tóxica, em um modelo agudo da DA não há tempo suficiente para ter a manifestação significativa dessa maior toxicidade. Com isso, houve a união entre esses dois grupos, formando um único denominado  $\beta$ A.

### 3.2.2. Teste do Campo Aberto (CA)

Para a execução do teste do CA, os animais foram colocados individualmente em uma arena circular constituída por vários quadrantes, delimitada por um aparato circular de acrílico escuro, com raio de 60 cm, que não permitia que os animais visualizassem o ambiente externo. Vinte e quatro horas antes do teste, há um período de habituação a arena por 15 minutos. No dia seguinte, os animais foram colocados novamente na arena por 15 minutos e os seus comportamentos espontâneos foram avaliados. Para a análise do comportamento espontâneo dos animais, com base em Speller & Westby (1996), foram quantificados os seguintes comportamentos:

- Autolimpeza: limpar o focinho, as garras, as patas anteriores e posteriores, as genitais, a cauda, a cabeça, o dorso e o ventre;
- Elevação: ficar sobre as patas traseiras apoiado ou não nas paredes da arena;
- Locomoção: caminhar pela arena;
- Imobilidade: quando o animal permanece imóvel, podendo movimentar apenas a direção da cabeça

Para análise dos vídeos foi utilizado o software Anymaze (Stoelting Co®, Reino Unido), porém os comportamentos foram marcados manualmente na análise de cada vídeo no software. O tempo de autolimpeza e elevação eram contabilizados assim que o animal iniciava o comportamento. Já o comportamento de imobilidade só era contabilizado depois de meio segundo que o animal permanecia assim, de modo que paradas muito rápidas, como para mudar de direção, não foram contabilizadas.

Para tentar obter mais informações sobre o peptídeo, o teste do CA também foi utilizado para verificar possíveis sinais de ansiedade. Para isso, a arena do CA foi dividida em duas regiões: o círculo mais interno foi denominado centro e o mais externo foi denominado periferia. Sabe-se que camundongos evitam a parte central da arena do CA, tendendo a

permanecer mais tempo na periferia. Esse comportamento está relacionado a um medo inato de predadores e ansiedade (Romeo, 2003; Chen, 1994).

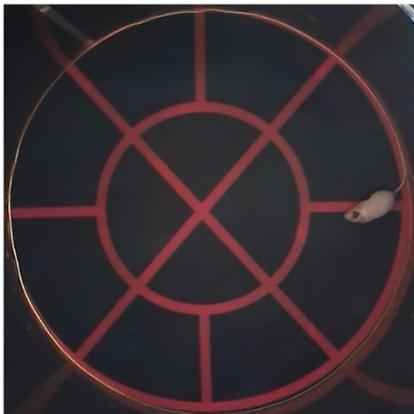


Figura 10: Foto do ensaio campo aberto. O animal foi colocado na arena no dia anterior por 15 minutos para adaptação. No dia do teste, o animal foi colocado na arena novamente por 15 minutos e foram analisados seus comportamentos espontâneos, como elevação, imobilidade e autolimpeza (fonte própria).

Para que não haja interferência no comportamento dos camundongos, a sala na qual foi realizada o ensaio estava a 25°C e a arena sempre foi limpa com álcool 70% entre cada um dos animais. A habituação e o teste foram gravados para posterior análise.

### 3.2.3. Teste de Reconhecimento de Objeto Novo (RON)

O RON possui uma metodologia bastante padronizada, sendo amplamente utilizado para avaliar a memória e a atenção em roedores. Ele pode ser utilizado em diferentes versões. Na versão utilizada neste trabalho, o teste foi composto por duas sessões de 5 minutos cada, e busca avaliar a memória de curto prazo dos animais.

Inicialmente, o animal foi colocado em uma caixa (22,8 x 28,4 x 40,3 cm) preta fosca, que não permite a visualização do ambiente externo. Para que não houvesse interferência no teste, os animais foram colocados na caixa por 5 minutos para a habituação. Após 24h se inicia o teste.

Na primeira sessão, cada animal foi colocado na caixa por 5 minutos e foi apresentado a ele dois objetos idênticos (Objeto Familiar). Após um intervalo de 15 minutos, o animal foi colocado novamente na caixa por 5 minutos, mas agora com um Objeto Familiar (OF) e um Objeto Novo (ON). Para verificar apenas se os animais conseguiriam distinguir os objetos apresentados, os objetos foram colocados no mesmo local na primeira e na segunda sessão, não havendo mudança no local onde os objetos foram posicionados.

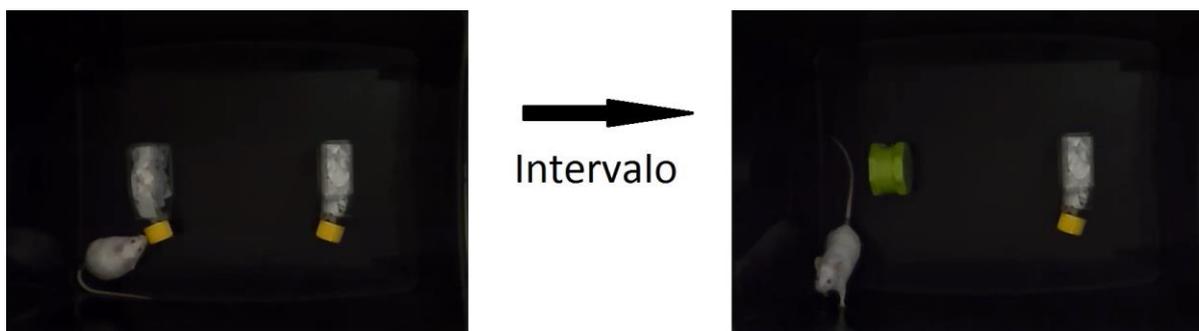


Figura 11: Fotos do teste RON. O animal foi colocado na caixa vazia no dia anterior ao teste para habituação. No dia do teste, o animal foi apresentado a dois objetos iguais (Objeto Familiar) por cinco minutos. Após um intervalo de 15 minutos, o animal foi colocado novamente na caixa, agora com um Objeto Familiar e um Objeto Novo (fonte própria).

O reconhecimento de um objeto novo em detrimento a um familiar requer uma habilidade cognitiva preservada, portanto, espera-se que animais saudáveis consigam reconhecer esta diferença entre os objetos e que os lesionados com a  $\beta$ A explorem os dois objetos na mesma proporção. Para avaliar o comportamento do animal, a exploração de cada objeto foi cronometrada e o tempo de cada um foi aplicado na fórmula  $(ON-OF)/(ON+OF)$ , que verificou o índice de discriminação entre os objetos. A ação de explorar cada objeto foi determinada quando o focinho do animal estava bem próximo e direcionado ou quando tocava o objeto (Leger, 2013).

Fatores externos podem influenciar a exploração do animal. Para evitar qualquer influência, a sala de ensaios foi mantida a 25°C, além de a caixa e os objetos serem limpos com álcool 70% entre um animal e outro para eliminar odores. Todo o ensaio foi gravado e a análise foi feita *a posteriori*, na qual foi quantificado o tempo de exploração dos objetos (Capurro, 2013; Antunes, 2012).

#### 3.2.4. Labirinto Aquático de Morris (LAM)

O terceiro teste comportamental é amplamente utilizado com roedores e avalia sua memória espacial e memória de médio prazo. Diferente dos outros testes, o LAM necessita de um período de treinamento dos animais antes da realização do teste.

Para sua realização, um reservatório circular (100,0 cm de diâmetro x 35,0 cm de altura) foi demarcado com quatro quadrantes, sendo que para cada um deles havia uma pista visual diferente, colocada na parede do ambiente. Ainda no reservatório, em um dos quadrantes havia uma plataforma submersa de plástico incolor (14,5 cm de altura x 4,5 cm de diâmetro). O reservatório foi preenchido com água a 25-28°C até ultrapassar a altura da

plataforma em aproximadamente 1,0 cm. O intuito deste teste é que o animal associe a pista visual ao quadrante que possui a plataforma e reconheça a localização da plataforma.

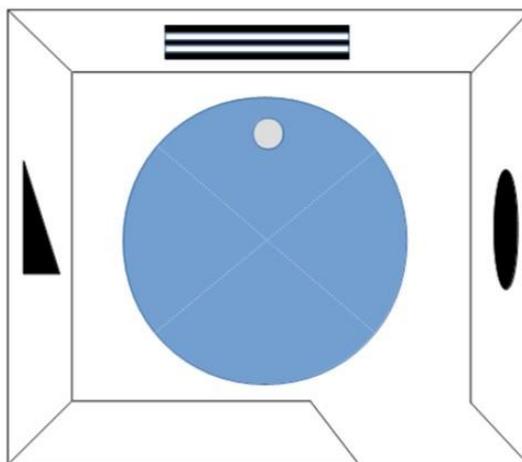


Figura 12: Esquema da sala onde ocorreu o LAM. Os animais foram colocados em um recipiente com água, no qual havia uma plataforma. O animal deveria usar as pistas visuais nas paredes como referência e memorizar o quadrante em que a plataforma se encontrava. Após 4 dias de treinamento, a plataforma era retirada e o animal permanecia por 60 segundos no recipiente e depois retirado (fonte própria).

Durante a fase de treinamento, cada animal foi colocado na água e teve 60 segundos para encontrar a plataforma de apoio. Caso encontrasse e ficasse na plataforma por 5 segundos, ele era retirado da água e seu tempo anotado. Caso não encontrasse, o animal era conduzido até a plataforma e lá permanecia por 30 segundos, a fim de que ele observasse as pistas visuais e as associasse com o local da plataforma. Em cada dia foram 6 sessões de treinamento para cada animal, variando o quadrante em que o animal era colocado no início de cada sessão.

Após quatro dias de treinamento, o teste foi realizado de maneira semelhante, porém sem a plataforma. Animais saudáveis tendem a ficar por mais tempo no quadrante em que antes havia plataforma. Além disso, espera-se que, na fase de teste, os animais com a  $\beta A$  fiquem mais tempo buscando a plataforma em comparação aos saudáveis. O teste e os dias de treinamento foram filmados e as latências para encontrar a plataforma registradas (Yun, 2014).

### 3.2.5. Análises histológicas

Finalizado os ensaios comportamentais, cada animal foi eutanasiado e perfundido para a remoção do cérebro. Cada animal recebeu anestesia com Tiopental sódico (60 mg/kg,

Cristália, Brasil) via intraperitoneal. Quando o animal não respondia mais a estímulos, ele foi imobilizado e teve a sua caixa torácica aberta. Feito isso, o ventrículo esquerdo do animal recebeu um influxo de 10mL de solução PBS e, em seguida, 10mL de solução fixadora de formaldeído a 4%.

Após a perfusão, os cérebros foram cuidadosamente retirados da caixa craniana e armazenados em formaldeído 4% a 4°C por alguns dias para a fixação completa dos tecidos. Dois dias antes da realização dos cortes histológicos, os cérebros foram retirados da solução de formaldeído e colocados em uma solução de sacarose 30% para manter íntegra a composição do tecido cerebral.

Para a realização dos cortes, cada cérebro foi fixado ao micrótomo de vibração (KD-400 Vibration Microtome, Zhejiang Jinhua Kedi Instrumental, China). Na região da formação hipocampal, as amostras foram cortadas em direção sagital com 30  $\mu$ m de espessura e separadas. Os cortes foram armazenados em solução anti-freezing até o momento da montagem das lâminas.

Para verificar os neurônios e os agregados de  $\beta$ A, os cortes dos cérebros dos animais foram submersos em solução PBS e posicionadas em lâminas previamente. Cada corte foi lavado duas vezes com solução PBS por 10 minutos. Em seguida eles foram incubados com solução de tioflavina T (Sigma-Aldrich®, EUA) e ácido clorídrico a 0,5%, na concentração de 10  $\mu$ g/mL por 15 minutos. Por ser fluorescente, a preparação com tioflavina foi realizada em câmara úmida e protegida da luz. Os cortes foram lavados novamente com PBS por 5 minutos, depois lavados com água destilada por mais 5 minutos. Finalizado o processo, foi adicionado DAPI (Fluoroshield Mounting Medium With DAPI, ab104139, Abcam®, EUA) e as fatias foram cobertas por lamínulas e seladas.

A região CA1 da formação hipocampal foi selecionada para a análise histológica. As imagens foram realizadas por uma câmera digital (DFC310 FX, Leica Microsystems, Alemanha) conectada a um microscópio de epifluorescência (DM 2000, Leica Microsystems, Alemanha) e a um computador. A partir das imagens captadas foi contabilizado manualmente o número de agregados fluorescentes de tioflavina.



## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Campo Aberto

Para a análise do teste de CA foram consideradas algumas atividades para parâmetro do comportamento espontâneo dos animais: distância percorrida, tempo imóvel, tempo de autolimpeza, tempo de elevação, tempo no centro e tempo na periferia.

Na análise do peptídeo fraternina-10, não houve diferença estatística nos dados de distância percorrida [ $F(4, 35) = 0,6931$ ;  $P = 0,1064$ ], o que revela que não havia comprometimento motor de nenhum dos grupos analisados (Figura 14).

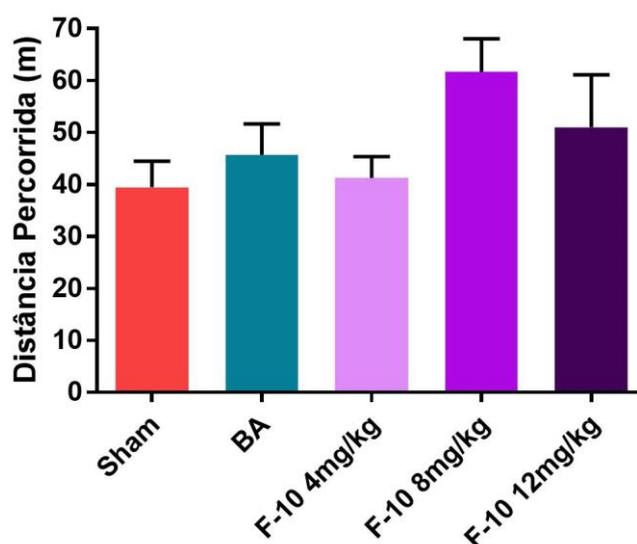


Figura 14: Gráfico da distância percorrida, em centímetros, pelos animais na área do CA. A análise estatística realizada foi a ANOVA, porém ela não mostrou diferença entre os grupos controle e tratados com fraternina-10.

Esperava-se que, por já terem passado pelo período de habituação no dia anterior, os animais *sham* fossem permanecer mais tempo em imobilidade em relação aos doentes. Porém não houve diferença entre os grupos na análise do tempo imóvel (Figura 15) [ $F(4, 40) = 0,8064$ ;  $P = 0,1797$ ]. Dvorkin (2008) fez um estudo sobre a memória de camundongos em um aparato do CA e conseguiu utilizar esse ensaio como um teste de memória. Ele testou dois modelos de animais transgênicos: C57BL/6, que é considerado com boa memória espacial, e DBA/2, que não apresenta boa memória. Entretanto, para chegar a esse resultado, Dvorkin utilizou pistas visuais no aparato ao redor da arena. O número de paradas perto da pista visual foi contabilizado e um maior número de paradas foi indicativo da preservação da memória, do tipo espacial. No presente estudo, este procedimento foi utilizado de modo semelhante no LAM e RON, contudo no CA não havia nenhum tipo de pista visual ou objeto para os animais.

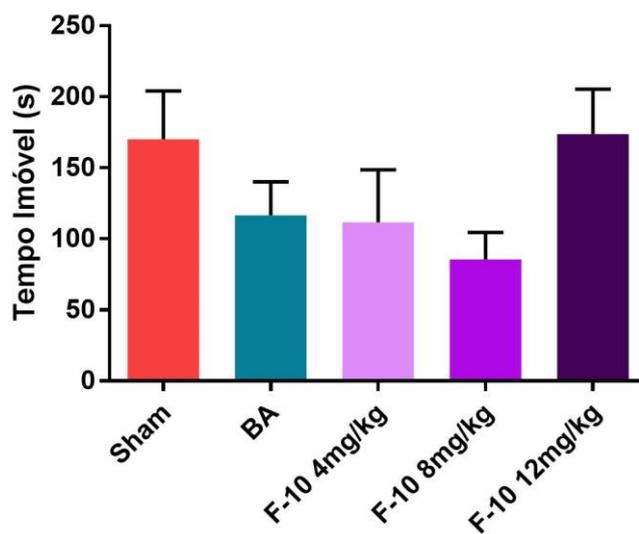


Figura 15: Gráfico da análise do tempo (em segundos) em que os animais ficaram imóveis no teste do CA. A análise estatística realizada foi a ANOVA, porém, este teste não mostrou diferença entre os grupos.

Dentre os comportamentos espontâneos também foram avaliados o de autolimpeza e de elevação. A partir das definições de Speller & Westby, foi verificado o tempo de autolimpeza e o tempo de elevação, que estão ilustrados nas Figuras 16 e 17). Não houve diferença entre os grupos [ $F(4, 41) = 0,7272$ ;  $P = 0,6433$  e  $F(4, 41) = 0,5919$ ;  $P = 0,3444$ , respectivamente] na análise destes dois parâmetros.

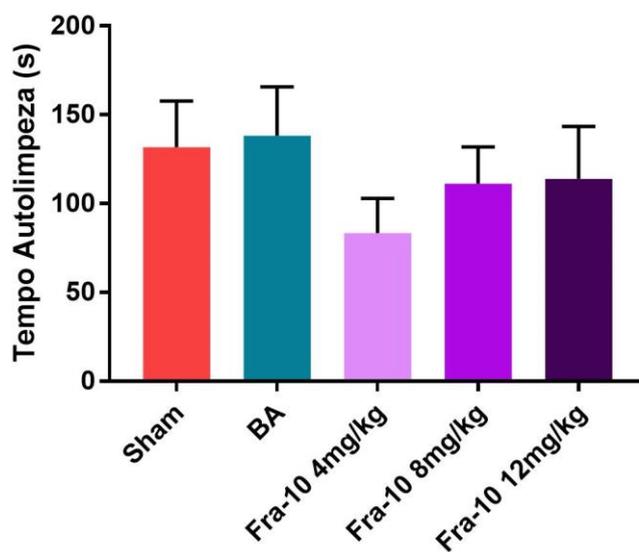


Figura 16: Representação, em segundos, do tempo de autolimpeza dos animais controle e tratados com a fraternina-10. A ANOVA não mostrou diferença entre os grupos representados.

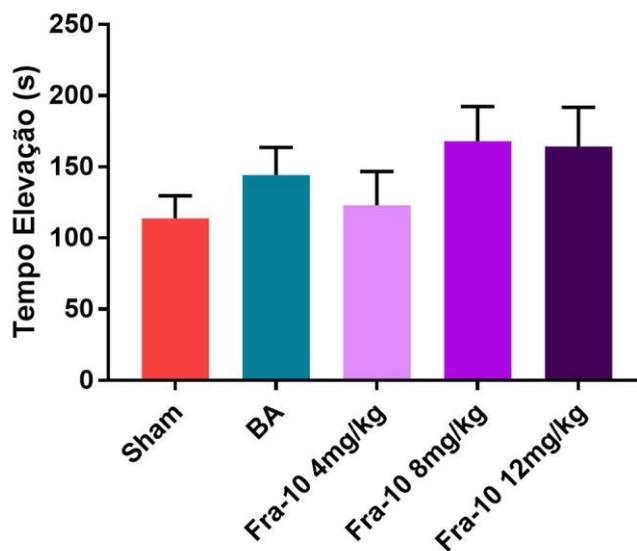


Figura 17: Análise do tempo de elevação dos animais durante o teste do CA. A ANOVA não mostrou diferença entre os grupos analisados.

Além da distância percorrida total, outros dois critérios que podem ser analisados para avaliar o comportamento de ansiedade são: tempo no centro e tempo na periferia. O círculo mais externo da arena foi denominado periferia e o círculo mais interno foi denominado centro. Camundongos tendem a não ficar muito tempo em áreas muito abertas, tendo preferência por cantos e quinas. Esse comportamento está relacionado com as reações de medo e ansiedade. Acredita-se que o mecanismo central dessas duas condições é processado pela mesma região do cérebro. Desta forma, é possível fazer uma relação entre a permanência do animal no centro e periferia da arena com ansiedade. (Tovote, 2015; Romeo, 2003; Chen, 1994).

Não houve diferença no tempo no centro entre os grupos (Figura 18), mostrando que o peptídeo não possui ação ansiolítica [ $F(4, 31) = 4,604$ ;  $P = 0,0937$ ]. Os animais também se comportaram de forma semelhante no tempo na periferia (Figura 19), reforçando que não houve alterações nos critérios de ansiedade [ $F(4, 35) = 0,9175$ ;  $P = 0,2896$ ].

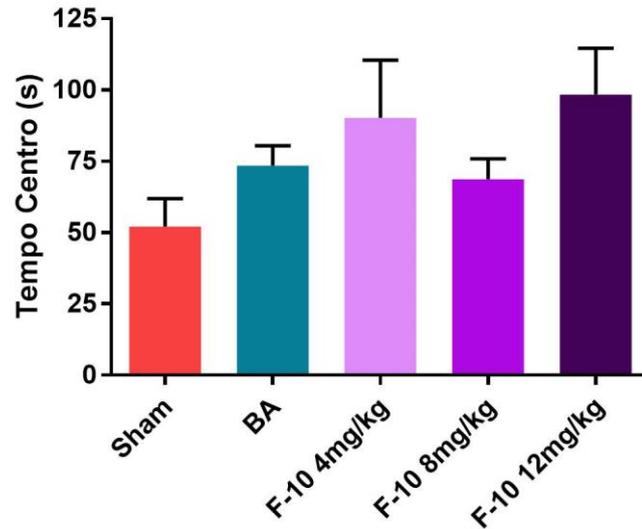


Figura 18: Representação do tempo que os animais permaneceram no círculo central do aparato do CA. A análise estatística realizada foi a ANOVA, porém ela não mostrou diferença entre os grupos analisados.

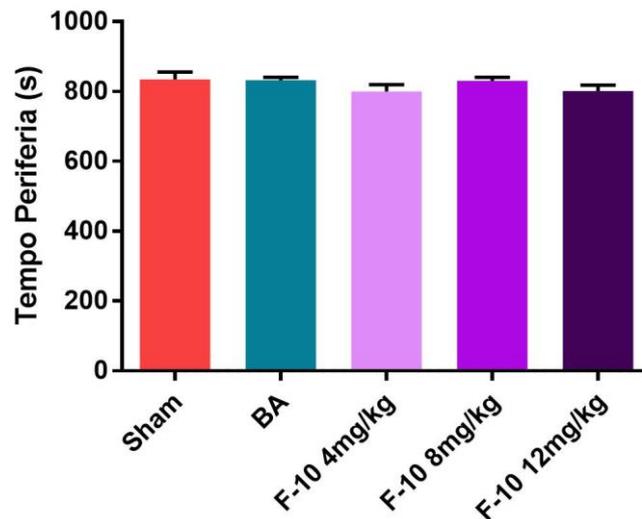


Figura 19: Representação do tempo que os animais permaneceram no círculo mais externo do aparato do CA. A análise estatística realizada foi a ANOVA, porém ela não mostrou diferença entre os grupos analisados.

Durante a análise do peptídeo octovespina, não houve diferença significativa [ $F(2, 26) = 1,706$ ;  $P = 0,0970$ ] na distância total percorrida pelos animais, revelando que os animais não possuíam nenhum tipo de comprometimento motor. Também não houve diferença no tempo imóvel [ $F(2, 27) = 0,03886$ ;  $P = 0,2010$ ] (Figuras 20 e 21, respectivamente). Outros estudos (Deacon, 2009 e Whyt 2018) também não obtiveram sucesso ao usar o teste do CA como teste de memória, corroborando com a hipótese de que este teste é muito eficiente na

análise de comprometimento motor e ansiedade, mas existem outros testes com resultados mais eficientes para verificar a memória dos animais.

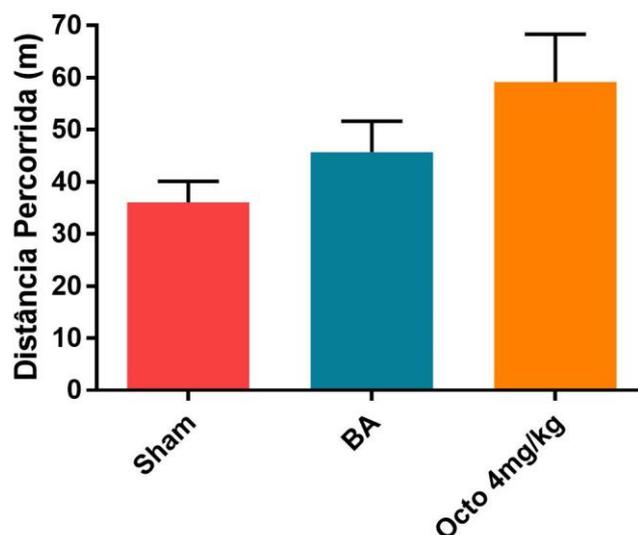


Figura 20: Análise da distância percorrida da arena do CA para observar os efeitos da octovespina. A ANOVA realizada não mostrou diferença significativa entre os grupos analisados.

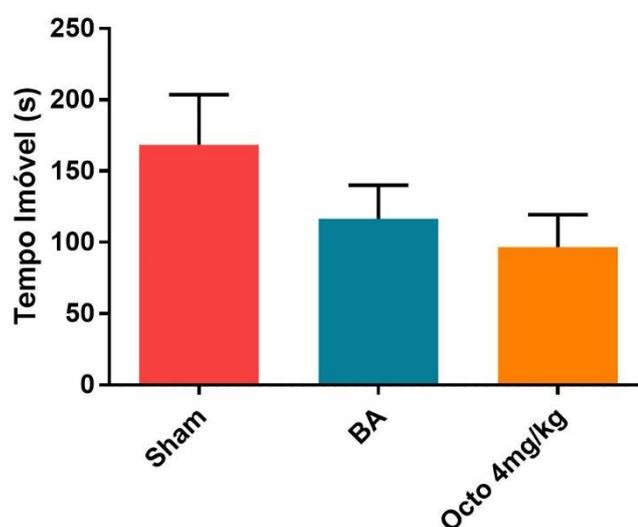


Figura 21: Gráfico da análise do tempo em que os animais ficaram imóveis no aparato durante o teste do CA. ANOVA foi realizada e não mostrou diferença entre os grupos.

Dos resultados mostrados nas figuras 22 e 23, ao analisar o comportamento de autolimpeza, não houve diferença entre os grupos analisados [ $F(2, 28) = 0,5046$ ;  $P = 0,5772$ ]. Porém, no comportamento de elevação, houve uma diferença entre o grupo *sham* e o grupo tratado com a octovespina [ $F(2, 28) = 2,21$ ;  $P = 0,0204$ ]. Novos estudos devem ser realizados para compreender melhor o motivo deste peptídeo ter alterado o comportamento de elevação dos animais. Uma possibilidade é que este comportamento, associado a um leve aumento na

análise da distância percorrida, seja resultado de um efeito ansiolítico do tratamento. Entretanto não houve diferença no tempo em que os animais permaneceram no centro e na periferia da arena do CA (Figura 24 e Figura 25).

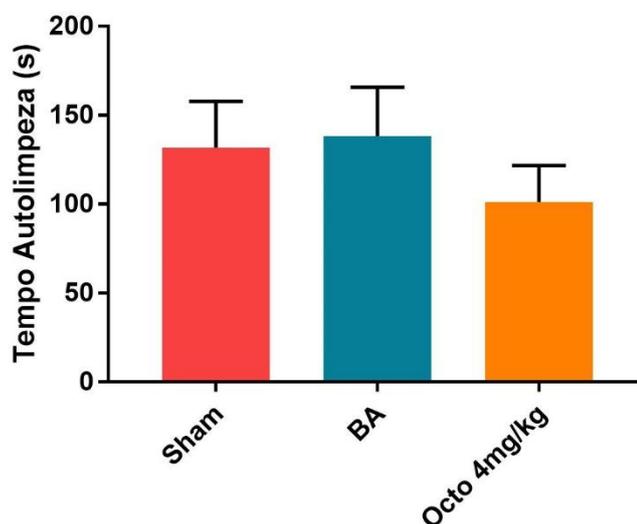


Figura 22: Representação, em segundos, do tempo de autolimpeza dos animais tratados com octovespina em comparação aos grupos controle. A ANOVA não mostrou diferença entre os grupos representados.

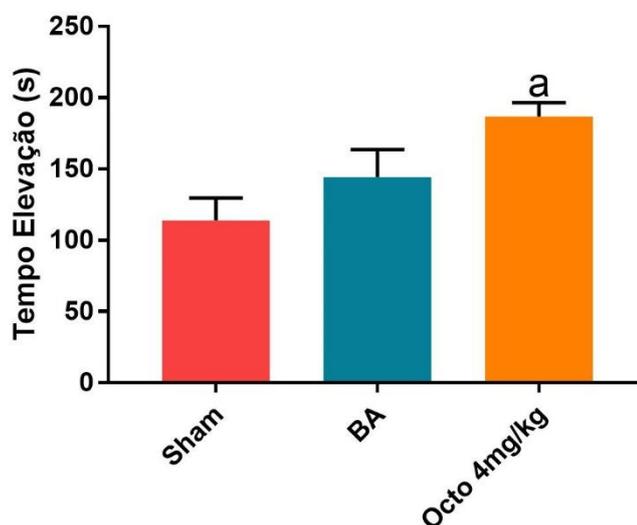


Figura 23: Análise do tempo de elevação dos animais durante o teste do CA. O grupo octovespina mostrou diferença significativa em relação ao grupo *sham* em a (  $P < 0,05$ )

Os dados sobre o tempo de permanência dos animais no centro e na periferia não possuem diferença [ $F(2, 23) = 0,1592$ ;  $P = 0,2274$  e  $F(2, 26) = 0,3484$ ;  $P = 0,5348$ , respectivamente], assim como na análise da fraternina-10. Desta forma, pode-se afirmar que o peptídeo octovespina também não causa alteração nos comportamentos associados à ansiedade dos animais.

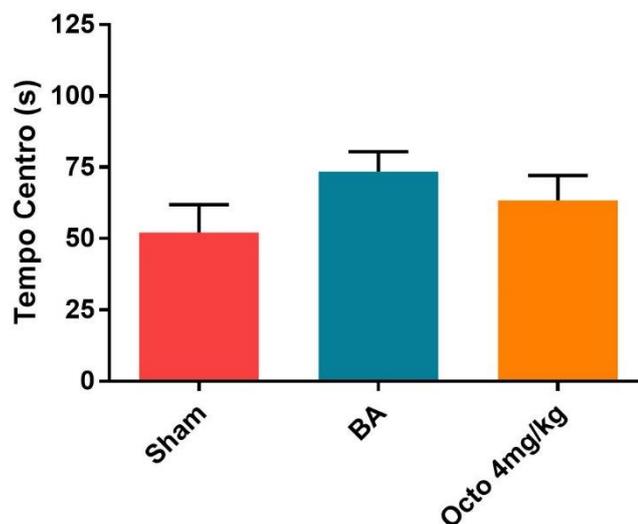


Figura 24: Representação do tempo que os animais permaneceram no círculo central do aparato do CA. A análise estatística ANOVA não mostrou diferença entre os animais tratados com octovespina e os demais grupos.

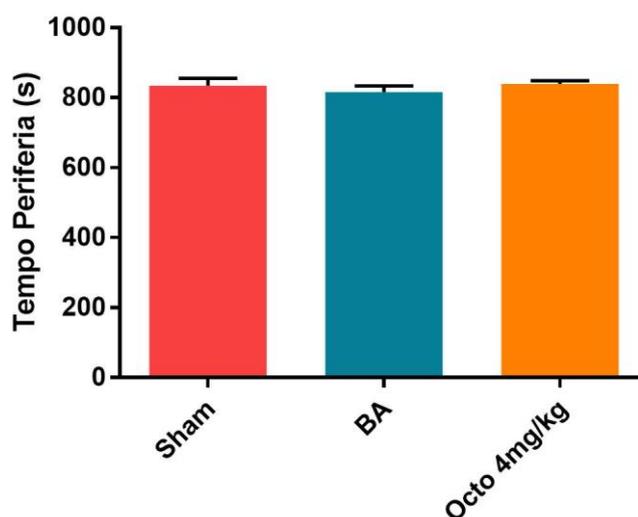


Figura 25: Representação do tempo que os animais permaneceram no círculo mais externo do aparato do CA. A análise estatística ANOVA não mostrou diferença entre os animais tratados com a octovespina e os demais grupos.

## 4.2. Reconhecimento de Objeto Novo

O segundo teste comportamental foi o RON, que foi realizado no mesmo dia do teste do CA. O índice de exploração foi determinado pela fórmula  $(N-F)/(N+F)$ , no qual N representa o tempo que o animal explorou o objeto novo, e F o tempo de exploração do objeto familiar. Quanto mais próximo de 1 for o valor do índice, mais o animal teve interesse pelo objeto novo. Quando mais próximo de -1, o índice mostra que houve uma preferência pelo objeto familiar. O valor do índice igual a 0 representa que o animal não teve preferência por nenhum dos dois

objetos. Para garantir que o resultado não fosse influenciado pelos objetos, metade dos animais teve uma garrafa de cultivo de células como objeto familiar e um apontador como objeto novo. Já a outra metade foi o oposto, teve o apontador como objeto familiar e a garrafa como objeto novo.

Outro fator determinante para a realização deste ensaio foi a escolha dos objetos. Para a validação deste teste, é importante que ambos os objetos tenham o mesmo nível de atração. Caso um objeto seja mais interessante que o outro, o animal pode explorá-lo mais, independente de lembrar se o objeto é novo ou familiar. Para isso, vários objetos foram testados previamente para verificar se eram adequados para a realização do experimento.

Neste teste, o grupo *sham* foi capaz de lembrar qual era o objeto novo em detrimento ao objeto familiar (índice = 0,3957), o que não ocorreu no grupo de animais que receberam a administração de  $\beta$ A (índice = -0,1263) [F (4, 39) = 0,6403; P = 0,0030]. Desta forma, foi possível verificar uma diferença significativa entre estes dois grupos (P = 0,0025).

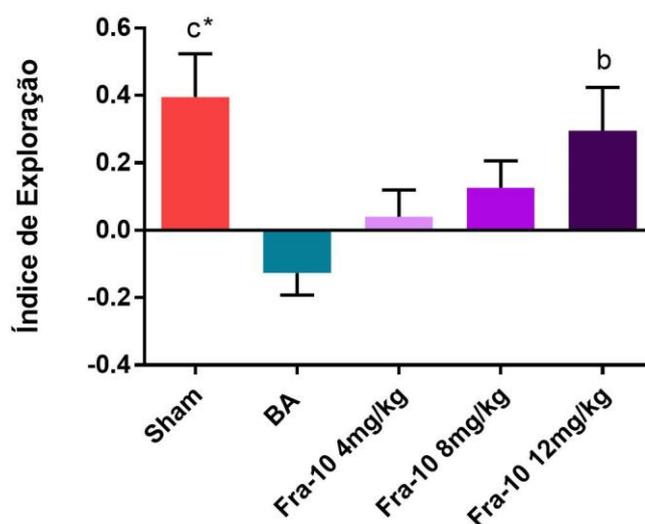


Figura 26: Índice de exploração dos animais, mostrando quando há uma diferença pelo objeto novo ou pelo objeto familiar. A ANOVA mostrou diferença significativa entre os grupos *sham* e BA representado em c\* (P < 0,01) e entre os grupos BA e Fra-10 12mg/kg, representado em b (P < 0,05)

A administração do peptídeo fraternina-10 na dose de 12 mg/kg também fez com que eles tivessem preferência em explorar o objeto novo (índice = 0,2956), havendo diferença significativa entre o grupo  $\beta$ A e o tratado com fraternina-10 na dose de 12 mg/kg (P = 0,0266).

O tratamento nas doses de 4 mg/kg e 8 mg/kg de fraternina-10 também resultaram nos animais preferindo o objeto novo (índice = 0,04029 e índice = 0,1264, respectivamente). Porém, ao comparar esses dados individualmente com o dos animais do grupo  $\beta$ A, não houve

diferença estatística entre eles ( $P = 0,7609$  e  $P = 0,3186$ , respectivamente). Apesar de não haver uma curva dose-dependente, é notável que a administração de todas as doses de fraternina-10 melhorou a capacidade dos animais em distinguir qual era o objeto novo. Neste teste, também foi possível verificar que o peptídeo consegue ultrapassar a barreira hematoencefálica.

Na análise do RON dos animais tratados com a octovespina, foi possível ver que os animais *sham* e os tratados com a dose de 4 mg/kg se comportaram de maneira semelhante (índice octovespina = 0,2171), mostrando diferença significativa entre o grupo  $\beta A$  e o tratamento ( $P = 0,0226$ ). Por ter sido testada somente uma dose, não é possível afirmar que essa é a melhor dose para o tratamento com a octovespina via subcutânea, porém é possível verificar que o peptídeo ultrapassa a barreira hematoencefálica. Outros estudos deverão ser realizados para verificar qual a melhor dose de administração do peptídeo octovespina via subcutânea.

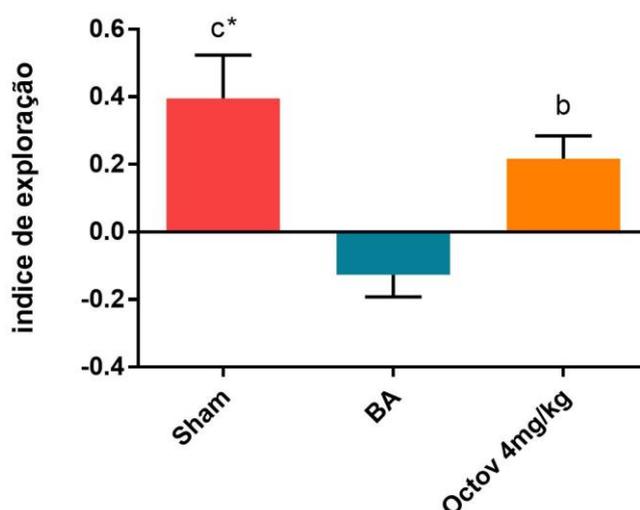


Figura 27: Índice de exploração dos animais, mostrando quando há uma diferença pelo objeto novo ou pelo objeto familiar. A ANOVA mostrou diferença significativa entre os grupos *sham* e BA, representado em c\* ( $P < 0,01$ ) e entre os grupos BA e Fra-10 12mg/kg, mostrado em b ( $P < 0,05$ )

### 4.3. Labirinto Aquático de Morris

O LAM é dividido em fase de treinamento e fase de teste. Esperava-se que os animais aprendessem a localização da plataforma e, com o passar dos dias, levassem cada vez menos tempo para achá-la. O treinamento iniciou no dia seguinte ao RON e seguiu por mais três dias. O gráfico de treinamento foi feito a partir da média do tempo que os animais levavam para encontrar a plataforma em cada um dos dias de treino.

Em média, nos dois primeiros dias de treinamento, os animais estão aprendendo a localização da plataforma e entendendo que eles devem permanecer nela para serem

retirados do aparato. Os resultados são mais nítidos a partir do terceiro dia de treino. Logo, a análise (ANOVA de duas vias) mostrou resultados significativos para o efeito do tempo [F (3,144) = 12.32;  $p < 0,0001$ ] e para o tratamento [F (4,144) = 4.675;  $p = 0.0009$ ], sendo que para a interação do tratamento-versus-tempo [F (12,144) = 1.042;  $p = 0.4144$ ] não foi observada significância.

Após bons resultados do RON, esperava-se que os animais tratados com a fraternina-10 lembrassem o local da plataforma ao longo dos dias de treinamento. Mas os animais que receberam o peptídeo não apresentaram melhora progressiva na latência da plataforma. Apesar de ter mostrado uma melhora significativa no teste do RON, os animais que receberam a dose de 12 mg/kg tiveram um desempenho semelhante aos que receberam  $\beta$ A durante os dias de treinamento do LAM [F (,40) = 3  $p < 0001$ ], do tem200) = 7.511;  $p < 0,0001$ ].

Animais que receberam 4 mg/kg também não apresentaram melhora na latência durante os dias de treinamento. Já a dose de 8 mg/kg mostrou a média do tempo semelhante ao grupo *sham*. Porém esse comportamento não se manteve ao longo dos 4 dias. A partir do terceiro dia, os dados mostram que há uma regressão no aprendizado dos animais. Ao final do treinamento, todos os grupos tratados com a fraternina-10 estão com a latência semelhantes ao grupo  $\beta$ A.

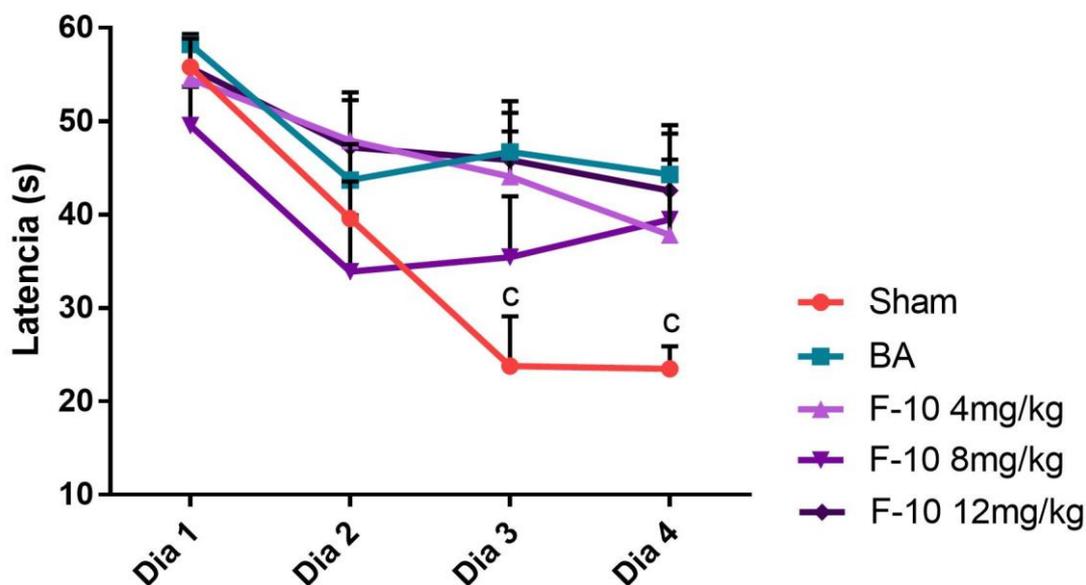


Figura 28: Representação do tempo que os animais demoraram para encontrara a plataforma ao longo dos dias de treinamento. A ANOVA de duas vias mostrou que houve diferença significativa entre o grupo *sham* e  $\beta$ A nos dias 3 e 4 de treinamento, representado por c ( $P < 0,05$ ).

O comportamento observado nos animais tratados com 8 mg/kg de fraternina-10 foi semelhante ao que aconteceu com os animais tratados com 4 mg/kg de octovespina. Nos primeiros dias de tratamento, os animais tratados se comportaram de modo igual aos animais

*sham*. Porém essa semelhança não ocorreu até o final do tratamento. É possível observar que, tanto com a octovespina quanto com a fraternina, o gráfico dos animais que receberam os tratamentos, que antes estava semelhante ao *sham*, sobe e se aproxima do grupo  $\beta$ A. Esse acontecimento pode ser explicado pois, no quarto dia de treino, os animais já estão a 4 dias sem receber nenhum tratamento. A análise (ANOVA de duas vias) mostrou resultados significativos para o efeito do tempo [F (3,64) = 15.00;  $p < 0,0001$ ], para o tratamento [F (1,64) = 14.76;  $p = 0.0003$ ] e para a interação do tratamento-versus-tempo [F (3,64) = 2.886;  $p = 0.0424$ ]. As diferenças se referem aos grupos controles, o grupo  $\beta$ A se mostrou diferente do grupo *sham* no terceiro e quarto dia, mostrando que os animais *sham* aprenderam a localização da plataforma e reduziram significativamente o tempo para encontrar a plataforma.

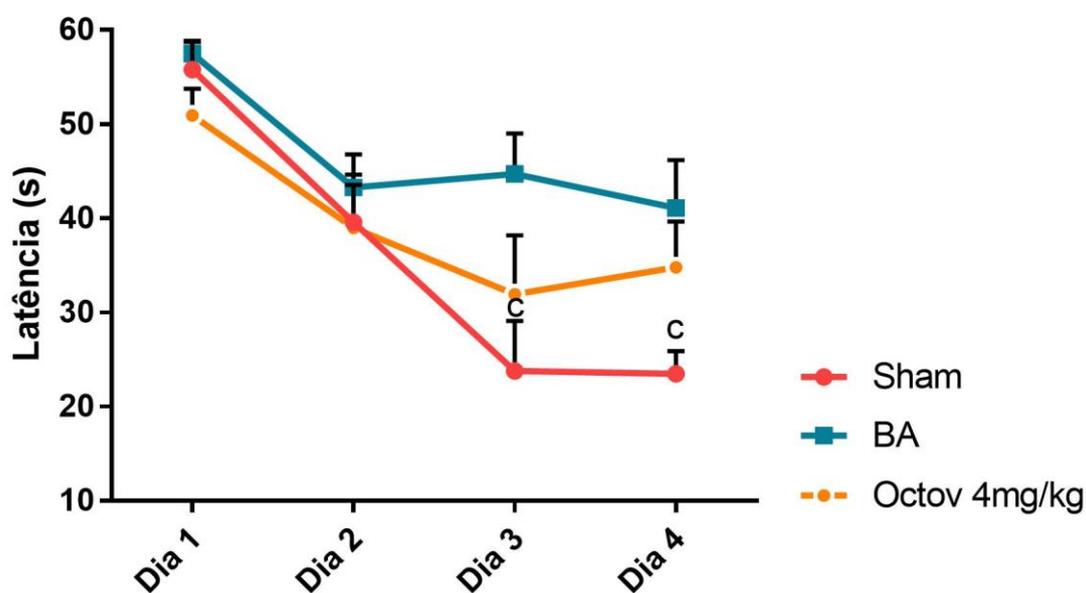


Figura 29: Latência do tempo em que os animais demoraram para achar a plataforma ao longo dos dias de treino do LAM. A ANOVA de duas vias mostrou que houve diferença significativa entre o grupo *sham* e  $\beta$ A nos dias 3 e 4 de treinamento, representado por c ( $P < 0,05$ ).

Recentemente, uma pesquisadora nosso grupo do Laboratório de Neurofarmacologia, testou a atividade da octovespina em modelo murino da DA. Camargo (2017) obteve resultados muito bons, mostrando uma melhora significativa nos animais que receberam tratamento, porém todos os seus testes foram com administração do peptídeo via i.c.v. Ainda, pesquisas do Laboratório de Neurofarmacologia, desenharam modelos análogos ao peptídeo selvagem fraternina, criando a fraternina-10 e a fraternina-14. Seus testes avaliaram a ação destes peptídeos (também via i.c.v) em um modelo murino da doença de Parkinson, na qual também obteve resultados satisfatórios (Biolchi, 2018).

Buscando uma melhor aplicabilidade dos compostos e a criação de fármacos que possam ser comercializados, o presente projeto testou o efeito dos peptídeos por uma administração sistêmica, e possivelmente, a capacidade dos peptídeos de ultrapassarem a barreira hematoencefálica. Ambos os peptídeos tiveram sucesso neste quesito, sendo administrados via subcutânea durante todo o estudo. Entretanto, houve uma mudança na via de administração, mas não houve uma mudança no protocolo criado por Camargo (2017). Ela mostrou que, aplicando o peptídeo por 7 dias consecutivos via i.c.v., ele conseguia manter sua eficácia por, pelo menos, 6 dias após o fim do período de tratamento. Nestes 6 dias posteriores foram realizados os ensaios comportamentais. Seu trabalho apresentou resultados constantes e coerentes até o último ensaio comportamental.

No presente trabalho foi possível observar que os animais responderam ao tratamento com a fraternina-10 e a octovespina durante o RON (24 horas sem tratamento) e apresentaram uma curva de aprendizado durante os dois primeiros dias de treino do LAM (72 horas sem tratamento), já que possuem comportamento semelhante aos animais do grupo *sham*. A fraternina-10 já não mostrou resultados consistentes a partir do terceiro dia de treinamento (96 horas sem tratamento), chegando ao quarto dia de treino com resultados semelhantes ao grupo  $\beta$ A. Já no gráfico da octovespina é possível verificar que sua eficiência persistiu até o terceiro dia de treino, mas no quarto dia (120 horas sem tratamento) houve uma piora no tempo dos animais.

Fazendo uma analogia deste estudo com os anteriores, é possível verificar que, na menor dose administrada, os animais não tiveram uma melhora consistente durante todos os dias de treinamento. A dose de 0,05 nmol de octovespina administrada via i.c.v. melhorou a latência dos animais em achar a plataforma, entretanto, a partir do terceiro dia de treinamento (96 horas sem tratamento), o gráfico apresenta uma leve alteração, e começa a se aproximar mais do gráfico dos animais doentes com a  $\beta$ A.

Esta análise é importante para explicar os resultados obtidos no teste do LAM. Após 4 dias de treinamento, os animais foram submetidos ao teste do LAM. Cada animal foi colocado uma única vez no aparato aquático por 60 segundos, porém agora sem a plataforma. Para a análise deste teste, o aparato foi dividido em 4 quadrantes, sendo um deles o quadrante em que se encontrava a plataforma. A partir disso, foram analisados três parâmetros: Distância Total Percorrida, Número de Entradas no Quadrante da Plataforma e o Tempo no Quadrante da Plataforma.

Ao observar o gráfico de Distância Total Percorrida (Figura 30), não é observada diferença entre os grupos estudados [ $F(4, 37) = 0,9571$ ;  $P = 0,9711$ ]. Assim, pode-se afirmar que os animais não possuem nenhum tipo de comprometimento motor. Este dado já havia

sido analisado no teste de CA, no qual também não mostrou diferença entre os grupos. Então, pode-se afirmar que essa característica não foi alterada ao longo dos dias dos ensaios comportamentais.

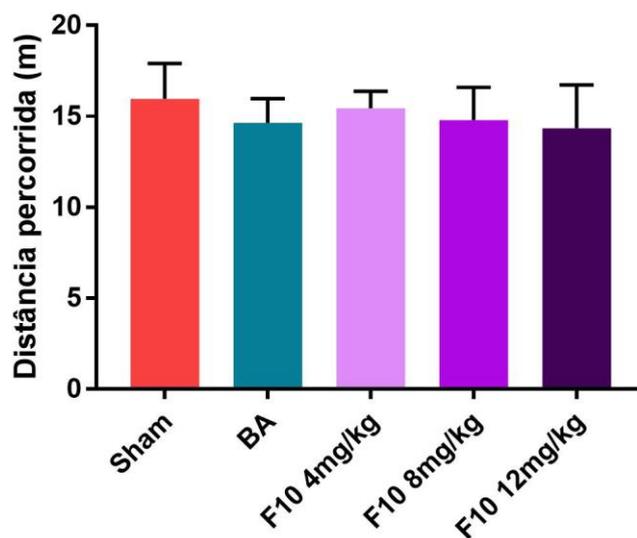


Figura 30: Distância percorrida em centímetros pelos animais no aparato aquático. Não houve diferença entre os grupos segundo a análise ANOVA

No gráfico de número de entradas na plataforma (Figura 31), foi possível observar diferença na ANOVA [ $F(4, 32) = 0,8301$ ;  $P = 0,0117$ ]. Este fato será analisado melhor na análise histológica. Ao realizar o pós-teste entre os grupos *sham* e  $\beta A$ , é possível ver que há uma diferença entre os grupos ( $P = 0,0151$ ). No teste T entre os grupos *sham* e tratamento de 8 mg/kg e entre *sham* e tratamento 12 mg/kg, não houveram diferenças ( $p = 0,9166$  e  $p = 0,7294$  respectivamente), mostrando que há uma grande semelhança comportamental entre os grupos. O pós-teste entre os grupos  $\beta A$  e o tratamento de 8 mg/kg também mostrou diferença entre esses grupos ( $P = 0,0273$ ), porém o teste entre  $\beta A$  e o tratamento de 12 mg/kg não mostrou diferença estatística entre os grupos ( $P = 0,0517$ ). Essas doses melhoraram o desempenho dos animais, mesmo após 144 horas sem receber tratamento. Estes resultados possivelmente seriam melhores se não houvesse um período tão grande entre a administração da última dose e o teste do LAM.

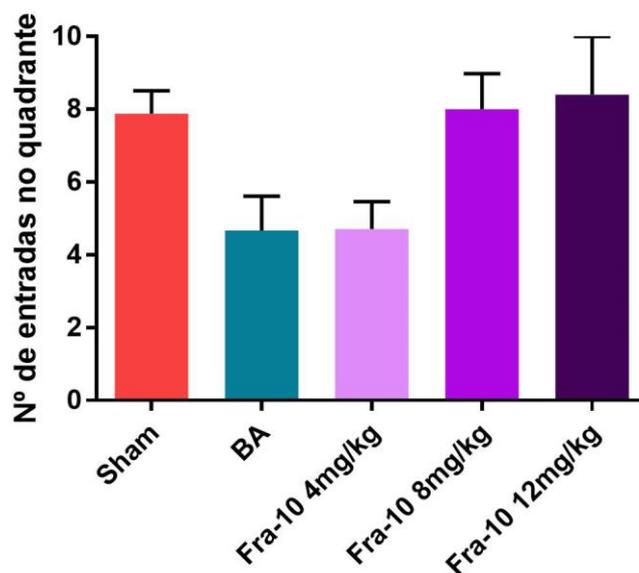


Figura 31: Representação gráfica do número de entradas no quadrante em que se encontrava a plataforma durante os dias de treino. Não houve diferença entre os grupos segundo a ANOVA.

Ao avaliar o tempo no quadrante da plataforma, o teste ANOVA mostrou diferença entre os grupos [ $F(4, 28) = 0,9453$ ;  $P = 0,0499$ ]. O tempo dos grupos *sham* e  $\beta A$  se assemelham aos encontrados por Camargo (2018) em seu estudo, fato que corrobora com o bom funcionamento do teste. Analisando os resultados do teste T, *sham* e tratamento de 8 mg/kg possui valor de  $P = 0,4794$ , mostrando comportamento semelhante entre os grupos. Por outro lado, *sham* e  $\beta A$  possui  $P = 0,0020$ , e o tratamento de 8 mg/kg com a  $\beta A$  possui o valor de  $P$  igual a 0,0480. Neste caso pode-se inferir que os animais que receberam essa dose de fraternina-10 tiveram um bom aprendizado ao longo dos quatro dias de treinamento. Este aprendizado talvez seja restrito ao local da plataforma, já que os animais passaram tanto tempo neste quadrante quanto o grupo *sham*. O fator que não foi aprendido durante o treinamento é que o animal deveria parar na plataforma para ser retirado do aparato aquático. Por isso a latência dos animais tratados durante o treinamento se assemelha ao grupo  $\beta A$ . Mas isso não descarta o fato de o animal saber qual é o quadrante da plataforma.

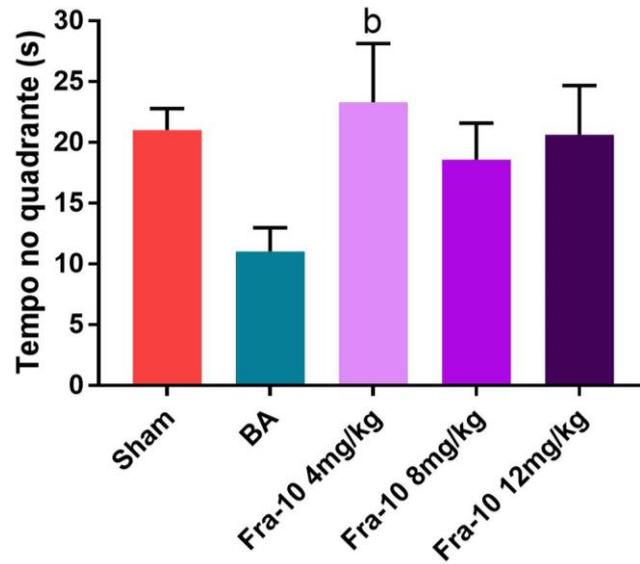


Figura 32: Tempo que os animais permaneceram no quadrante em que estava a plataforma. Estes dados corroboram com o trabalho de Camargo (2017). A ANOVA mostrou diferença significativa entre o grupo  $\beta$ A e o tratado com 4 mg/kg de fraternina-10, representado por b ( $P < 0,05$ ).

O mesmo teste foi realizado com os animais tratados com 4 mg/kg de octovespina. Comparando a distância total percorrida, não há diferença entre os grupos [ $F(2, 26) = 0,6939$ ;  $P = 0,8179$ ], mostrando que estes animais também não desenvolveram problemas de locomoção ao longo dos ensaios comportamentais.

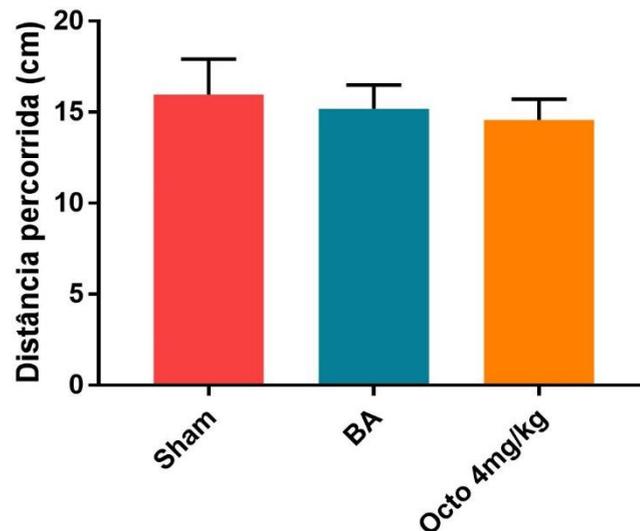


Figura 33: Distância percorrida em centímetros pelos animais no aparato aquático, comprovando que não houve comprometimento motor ao longo dos dias de ensaio comportamental. Não houve diferença significativa entre os grupos analisados segundo a ANOVA.

A ANOVA do Número de entradas no quadrante da plataforma mostra uma diferença significativa [ $F(2, 22) = 1,849$ ;  $P = 0,0236$ ] entre o grupo *sham* e  $\beta A$  ( $P = 0,0187$ ). Apesar de não haver diferença entre os grupos  $\beta A$  e octovespina ( $P = 0,2291$ ), também não há diferença entre *sham* e octovespina ( $P = 0,4452$ ). O peptídeo gera uma melhora no aprendizado do animal, contudo estes resultados são decorrentes de um período de 144 horas sem a administração do tratamento. Possivelmente haveria uma diferença significativa entre o grupo de animais doentes e os tratados caso não houvesse este lapso.

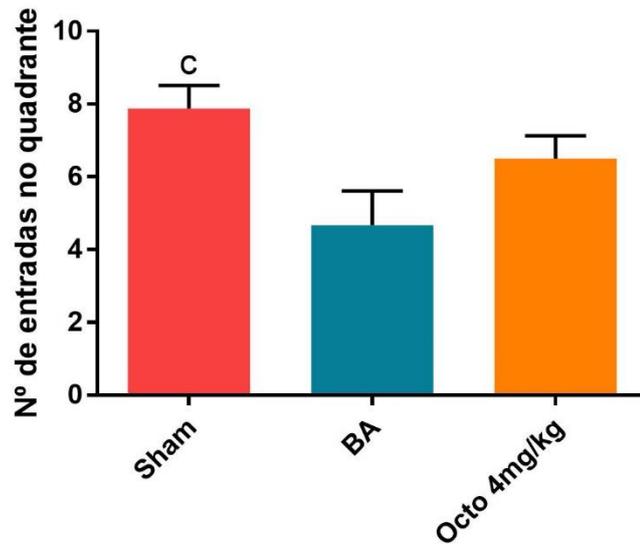


Figura 34: Distância percorrida em centímetros pelos animais no aparato aquático. A ANOVA mostra diferença entre os grupos *sham* e o grupo  $\beta A$ , representado por c ( $P < 0,05$ ).

O último critério analisado foi o tempo no quadrante da plataforma. A ANOVA mostrou diferença estatística entre os três grupos analisados [ $F(2, 21) = 0,1739$ ;  $P = 0,0199$ ]. Entretanto, o teste T mostra um valor de  $P = 0,0151$  entre o grupo *sham* e o grupo doente.

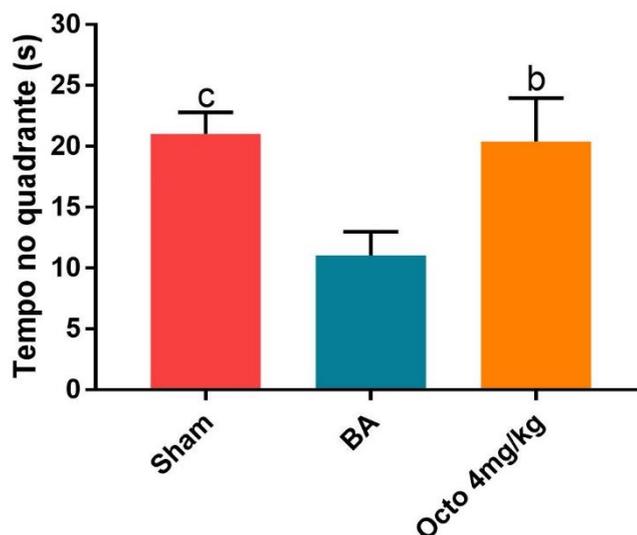


Figura 35: Tempo que os animais permaneceram no quadrante em que estava a plataforma. Estes dados corroboram com o trabalho de Camargo (2017). A ANOVA mostrou que há uma diferença entre os dados do grupo *sham* e  $\beta$ A, representado por c ( $P < 0,05$ ) e também entre os grupos  $\beta$ A e o grupo tratado com a octovespina, representado por b ( $P < 0,05$ ).

#### 4.4. Análises histológicas

Após os ensaios comportamentais, os animais foram perfundidos e tiveram seu cérebro retirado para a análise histológica. Fatias de 30  $\mu$ m foram incubadas com solução de Tioflavina T a 10%, para a marcação dos agregados. No início do século XX, o principal corante para a  $\beta$ A era o vermelho Congo. Porém, este corante demanda muita experiência de uso, além do uso de luz polarizada. Por fim, a afinidade deste corante não é tão intensa (Picken, 2012).

Em 1959, foi publicado um artigo com o uso da Tioflavina T para marcação histológica dos agregados da  $\beta$ A. O mais marcante foi o fato da mudança de emissão de fluorescência deste corante, o que facilita sua visualização em cortes. Outro fator que aumenta a credibilidade do uso da Tioflavina é que ela se liga a follha- $\beta$ , estrutura bem marcante da  $\beta$ A (Malmos, 2017; Picken, 2012).

Sendo assim, no presente trabalho, a análise dos cortes histológicos possibilitou verificar os agregados de  $\beta$ A marcados com Tioflavina T. Os agregados foram contados manualmente e a ANOVA seguida pelo teste de Tukey foi realizada para verificar a diferença significativa entre os grupos.

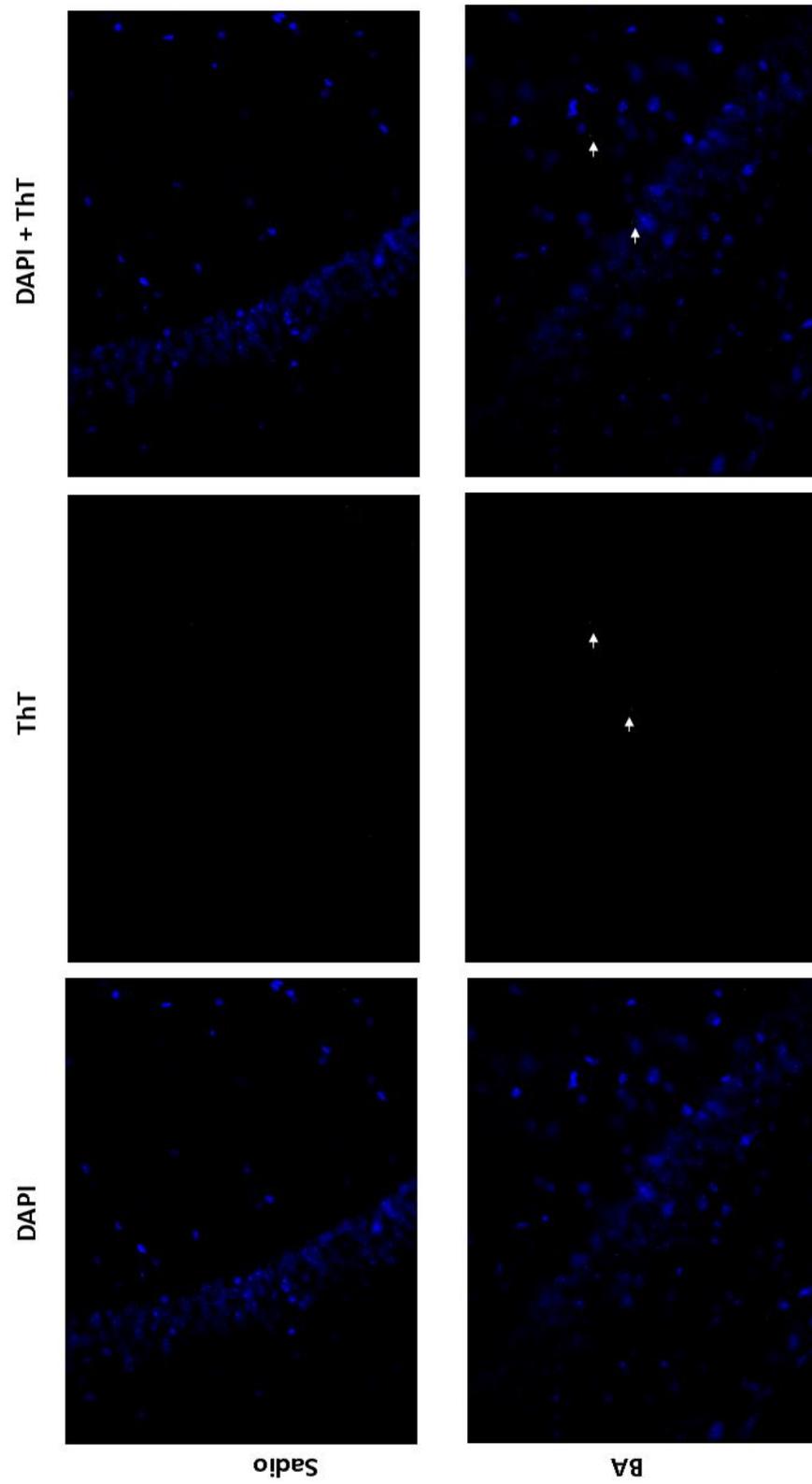


Figura 36: Amostras dos cortes histológicos feitos com a marcação de DAPI e Tioflavina T

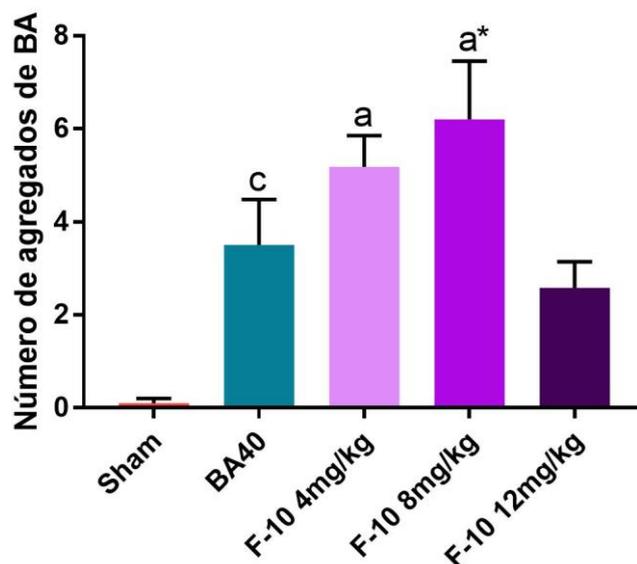


Figura 37: Média da quantidade de agregados de  $\beta$ A encontrados nas amostras histológicas. A análise estatística ANOVA mostrou diferença significativa entre os grupos *sham* e  $\beta$ A, representada por c ( $P < 0,05$ ); diferença significativa entre o grupo *sham* e a dose de fraternina-10 de 4 mg/kg (no qual a representa valores de  $P < 0,05$ ) e entre o grupo *sham* e o grupo tratado com a dose de 8 mg/kg de fraternina-10, representado por a\* ( $P < 0,01$ ).

Apesar de o protocolo utilizado ser suficiente para a indução do déficit cognitivo nos animais, ele já mostrou que não é suficiente para verificar morte neural na formação hipocampal em um modelo agudo da DA (Camargo, 2017). Novos estudos devem ser realizados para determinar um protocolo para o modelo crônico desta doença e verificar quanto tempo é necessário para que seja possível detectar morte de neurônios.

Foi possível verificar uma diferença significativa entre os grupos [ $F(4, 45) = 2,715$ ,  $P = 0,0004$ ]. O número de agregados foi maior no grupo  $\beta$ A em relação ao grupo *sham*, mostrando um valor de  $P = 0,0030$ . Além disso, comparando com o grupo *sham*, fraternina-10 na maior dose não mostrou diferença significativa. Ao compararmos o grupo *sham* e 4 mg/kg, verificamos um valor de  $P$  igual a 0,0069, enquanto que comparado ao grupo de 8 mg/kg, o valor de  $P$  é de 0,0007, mostrando que nestas doses não houve um efeito desagregador.

A ANOVA também verificou diferença significativa entre os grupos durante o tratamento com a octovespina [ $F(2, 23) = 3,389$ ;  $P = 0,0080$ ]. Porém essa diferença só foi entre o grupo *sham* e o grupo  $\beta$ A ( $P = 0,059$ ). Entretanto foi possível verificar que não houve uma diferença no número de agregados do grupo tratado com a octovespina em relação ao grupo *sham*, mostrando uma redução parcial dos agregados.

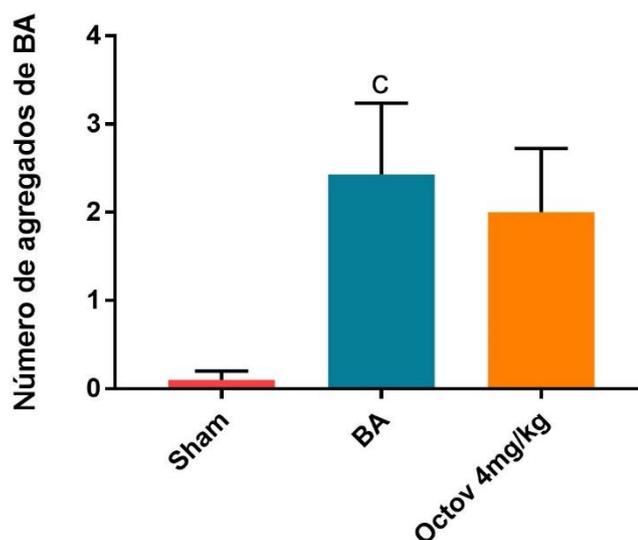


Figura 38: Representação da quantidade de agregados de  $\beta$ A nos cortes histológicos comparando os grupos com o tratamento com octovespina. A ANOVA mostrou que há uma diferença significativa no número de agregados dos grupos *sham* e  $\beta$ A, representado por c ( $P < 0,05$ ).

O número de agregados no protocolo utilizado é muito inferior se comparado a um modelo de animal transgênico para  $\beta$ A (Urbanc, 2002). Isso faz com que a visualização dos agregados de tioflavina seja mais difícil. Além disso, os grupos tratados tanto com a fraternina-10 quanto com a octovespina não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo  $\beta$ A. O estudo realizado por Camargo (2017), no qual a octovespina foi administrada via i.c.v, mostrou uma redução no número de agregados, porém esta diferença não foi significativa entre os grupos. No presente estudo, como já discutido anteriormente, ao finalizar os ensaios comportamentais, os animais já estavam a seis dias sem receber tratamento. Desta forma, uma possível explicação é que a octovespina foi metabolizada pelo organismo, diminuindo a sua disponibilidade. Assim, os agregados de  $\beta$ A novamente se reagrupando, gerando os resultados apresentados. Novos estudos devem ser realizados para verificar se, com a continuidade do tratamento ao longo dos dias dos ensaios comportamentais, se a octovespina consegue diminuir significativamente o número de agregados de  $\beta$ A. Outra alternativa, é utilizar a octovespina em um modelo crônico da DA e verificar sua ação.

#### 4.5. Análise dos peptídeos

As pesquisas por novos fármacos para o tratamento da DA são inúmeras, uma vez que não existe um medicamento efetivo para a cura desta doença. Outra razão é que a quantidade de alvos farmacológicos possíveis é extensa, já que a DA é extremamente complexa e não se sabe ao certo qual é o elemento-chave causador desta doença.

Mesmo vários estudos mostrando que a  $\beta$ A ou a TAU são os fatores determinantes para a doença, estudos mostraram que o processo inflamatório instalado em estágios avançados da doença é tão intenso que somente a retirada da TAU e  $\beta$ A não seria suficiente para a cura. Sendo assim, dois tratamentos interessantes seriam: a criação de um fármaco que conseguisse desagregar os aglomerados de  $\beta$ A no cérebro de pacientes ou um fármaco que diminuísse o processo inflamatório estabelecido no cérebro de pacientes na DA.

Vários estudos conseguiram compreender como ocorre a agregação da  $\beta$ A, sendo a sua região hidrofóbica (17KLVF20F) a mais importante para este processo. Soto (1996) e Austen (2008) conseguiram sintetizar peptídeos que diminuíram a agregação da  $\beta$ A. Ambos criaram peptídeos que se unem a essa região e impedem a polimerização da  $\beta$ A e, desta forma, a degradação da  $\beta$ A pode ser realizada pelo cérebro do paciente.

Convergindo com este pensamento, o peptídeo octovespina foi sintetizado a partir do peptídeo selvagem ocidentalina. Porém sua sequência foi alterada para poder se ligar a região hidrofóbica da  $\beta$ A. Camargo (2018) mostrou em seu estudo que essa alteração no peptídeo foi eficiente e que o número de agregações de  $\beta$ A na região CA1 no cérebro de camundongos diminuiu se comparado ao grupo doente. No presente trabalho também houve a diminuição no número de agregados, porém mais estudos são necessários para verificar a melhor dose administrando o peptídeo por via subcutânea.

Adicionalmente, Biolchi (2018) buscou em seu trabalho determinar qual seria o alvo farmacológico da fraternina e seus derivados. Ao comparar este peptídeo com outros isolados de vespas, a fraternina apresentou semelhança com peptídeos que possuem ação neuroprotetora. Por isso, este peptídeo foi selecionado pelo nosso grupo para ser testado. A fraternina e todos os seus derivados possuem uma conformação em  $\alpha$ -hélice e não foi desenhada pensando na interação com a  $\beta$ A, como foi o caso da octovespina. Apesar disso, ela possui 4 aminoácidos hidrofóbicos, que podem interagir com a  $\beta$ A. Os ensaios realizados por Biolchi (2018) mostraram que a fraternina não está relacionada com o bloqueio de receptores glutamatérgicos, com a memantina. Portanto, este peptídeo atua em outras vias que impedem a morte neural.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que ambos os peptídeos conseguiram passar a barreira hematoencefálica, fato que facilita sua administração. A maior dose da fraternina-10 demonstrou efeitos significativos no teste RON e na diminuição dos agregados de  $\beta$ A. Porém mais estudos são necessários para saber se esses efeitos vieram em decorrência da interação da fraternina-10 com a  $\beta$ A ou se a fraternina-10 diminuiu o processo inflamatório instaurado no cérebro dos camundongos e isso determinou um melhor desempenho no ensaio comportamental de RON, além de auxiliar o processo fagocítico realizado pela micróglia.

## 5. Conclusão

A partir dos dados apresentados, pode-se concluir que:

- Ambos os peptídeos ultrapassam a barreira hematoencefálica, podendo ser administrados via subcutânea
- A ação da octovespina de impedir a formação de agregados de beta-amiloide se mantém preservada quando administrada por esta via.
- A fraternina-10 consegue proteger o cérebro contra os efeitos da Doença de Alzheimer em modelo agudo da doença
- O protocolo utilizado não foi eficiente para verificar o real potencial dos peptídeos, sendo necessário novos estudos para a criação de um novo protocolo experimental e, desta forma, determinar a melhor dose de administração de ambos os peptídeos por esta via de administração.

## 6. Referências Bibliográficas

Antunes, M & Biala, G. (2011). The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive processing*, 13, 93-110. 10.1007/s10339-011-0430-z.

Austen BM, Paleologou KE, Ali SAE, Qureshi MM, Allsop D, El-Agnaf OMA. Designing peptide inhibitors for oligomerization and toxicity of Alzheimer's  $\beta$ - amyloid peptide. *Biochemistry*. 2008;47(7):1984–92.

Bagyinszky, E., Giau, V. Van, Shim, K., Suk, K., An, S. S. A., & Kim, S. Y. (2017). Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 376, 242–254.

Barage, S. H., & Sonawane, K. D. (2015). Neuropeptides Amyloid cascade hypothesis : Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Ynpep*, 52, 1–18.

Biolchi, A. M. Avaliação antiparkinsoniana e neuroprotetora do peptídeo Fraternina isolado da peçonha da vespa *Parachartergus fraternus* no modelo murino da Doença de Parkinson. [s.l.] Universidade de Brasília, 2013.

Blennow, K., Leon, M. J. de, & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer 's Disease. *Lancet*, 368(368), 387–403.

Bohnen, N.; Grothe, M.; Ray, N.; Muller, M.; Teipel, S. (2018). Recent Advances in Cholinergic Imaging and Cognitive Decline—Revisiting the Cholinergic Hypothesis of Dementia. *Current Geriatrics Reports*. 7. 1-11. 10.1007/s13670-018-0234-4.

Bolós, M., Perea, J. R., & Avila, J. (2017). Alzheimer's disease as an inflammatory disease. *Biomolecular Concepts*, 8(1), 37–43.

Burguillos, M. A., Deierborg, T., Kavanagh, E., Persson, A., Hajji, N., Garcia-Quintanilla, A., Joseph, B. (2011). Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature*, 472(7343), 319–324.

Butterfield, D. A., Swomley, A. M., & Sultana, R. (2013). Amyloid  $\beta$ -peptide (1-42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(8), 823–35.

Camargo, L. C. Avaliação neuroprotetora do peptídeo octovespina, bioinspirado da peçonha de vespa social, em um Brasília. 2017

Campos, G.A.A. Avaliação da ação antiparkinsoniana do peptídeo Neurovespina no modelo murino da Doença de Parkinson. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade de Brasília. 2016

Canter, R. G., Penney, J., & Tsai, L. H. (2016). The road to restoring neural circuits for the treatment of Alzheimer's disease. *Nature*, 539(7628), 187–196.

Capurro, V., Busquet, P., Lopes, J. P., Bertorelli, R., Tarozzo, G., Bolognesi, M. L., Cavalli, A. (2013). Pharmacological Characterization of Memoquin, a Multi-Target Compound for the Treatment of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, 8(2).

Carneiro, L. dos A. Avaliação da atividade antiepiléptica e da expressão neuronal de c-fos de dois peptídeos sintetizados a partir da Occidentalina- 1202 isolada da vespa social *Polybia occidentalis*. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade de Brasília. 2013.

Cavanaugh, S. E., Pippin, J. J., & Barnard, N. D. (2014). Animal models of Alzheimer disease: Historical pitfalls and a path forward. *AlzDis*, 31(3), 279–302.

Chen, C., Rainnie, D., Greene, R., & Tonegawa, S. (1994). *Abnormal fear response and aggressive behavior in mutant mice deficient for alpha-calcium-calmodulin kinase II*. *Science*, 266(5183), 291–294.

Couto, L.L., do dos Anjos LC, Araujo M de AF, Mourão CA, Schwartz CA, Ferreira LB, et al. Anticonvulsant and anxiolytic activity of the peptide fraction isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Pharmacogn Mag [Internet]*. 2012;8(32):292–9.

Coyle, J., Price, D., & DeLong, M. (1983). Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, 219(4589), 1184–1190.

Deacon, Robert & Koros, Eliza & Bornemann, K.D. & Rawlins, John. (2008). Aged Tg2576 mice are impaired on social memory and open field habituation tests. *Behavioural brain research*. 197. 466-8. 10.1016/j.bbr.2008.09.042

Dias, K. S. T.; de Paula, C. T.; Riquiel, M. M.; Lago, S. T.; Costa, K. C. M.; Vaz, S. M.; Machado, R. P.; Lima, L. M. S.; Viegas Junior, C. (2015) Aplicações Recentes da Abordagem de Fármacos Multialvo para o Tratamento da Doença de Alzheimer. *Rev. Virtual Quim.*, 2015, 7 (2), 609-648.

Dinamarca, M. C., Sagal, J. P., Quintanilla, R. A., Godoy, J. A., Arrzola, M. S., & Inestrosa, N. C. (2010). Amyloid- $\beta$ -Acetylcholinesterase complexes potentiate neurodegenerative changes induced by the A peptide. Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 5(1), 4.

Dos Anjos, L. C., Gomes, F. M. M., Do Couto, L. L., Mourão, C. A., Moreira, K. G., Silva, L. P., & Mortari, M. R. (2016). Anxiolytic activity and evaluation of potentially adverse effects of a bradykinin-related peptide isolated from a social wasp venom. *Life Sciences*, 149, 153–159.

Dvorkin A, Benjamini Y, Golani I (2008) Mouse Cognition-Related Behavior in the Open-Field: Emergence of Places of Attraction. *PLoS Comput Biol* 4(2): e1000027.

Faucher, P., Mons, N., Micheau, J., Louis, C., & Beracochea, D. J. (2016). Hippocampal injections of oligomeric amyloid  $\beta$ -peptide (1-42) induce selective working memory deficits and long-lasting alterations of ERK signaling pathway. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7(JAN), 1–15.

Frye, C. A., Petralia, S. M., & Rhodes, M. E. (2000). Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -THP, 67.

Glennner, G. G., & Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 120(3), 885–890.

Götz, J., & Ittner, L. (2008). Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(7), 532–544.

Hempel, Harald & M. Mesulam, Marsel & Cuello, Augusto & Khachaturian, Ara & Farlow, Martin & Snyder, Peter & Giacobini, Ezio & Khachaturian, Zaven. (2017). Revisiting the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease: Emerging evidence from translational and clinical research. *Alzheimer's & Dementia*. 10

Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. El, Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14(April 2015), 388–405.

Herrup, Karl. (2015). The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nature neuroscience*. 18. 794-9.

Huang, Y., & Mucke, L. (2012). Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*, 148(6), 1204–1222.

Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL. Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science*. 1984;225(4667):1168–70.

Izquierdo, Ivan & H. Medina, Jorge. (1997). Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures. *Neurobiology of learning and memory*. 68. 285-316.

Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, Stefansson H, Sulem P, Gudbjartsson D, Maloney J et al (2012) A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488: 96 – 99

Jucker, M.; C Walker, L. (2011). Pathogenic Protein Seeding in Alzheimer Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Annals of neurology*. 70. 532-40. 10.1002/ana.22615.

Kamat, P. K., Kalani, A., Rai, S., Swarnkar, S., Tota, S., Nath, C., & Tyagi, N. (2016). Mechanism of Oxidative Stress and Synapse Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Understanding the Therapeutics Strategies. *Molecular Neurobiology*, 53(1), 648–661.

Karran, E., & De Strooper, B. (2016). The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *Journal of Neurochemistry*, 139, 237–252.

Kocahan, S., & Doğan, Z. (2017). Mechanisms of Alzheimer's Disease Pathogenesis and Prevention: The Brain, Neural Pathology, N-methyl-D-aspartate Receptors, Tau Protein and Other Risk Factors. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience: The Official Scientific Journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology*, 15(1), 1–8.

Krüger, L., & Mandelkow, E. M. (2016). Tau neurotoxicity and rescue in animal models of human Tauopathies. *Current Opinion in Neurobiology*, 36, 52–58.

Kumar, A., & Murleedharan, C. (2016). ScienceDirect Current and novel therapeutic molecules and targets in Alzheimer ' s disease. *Journal of the Formosan Medical Association*, 115(1), 3–10.

Kumar, A., Nisha, C. M., Silakari, C., Sharma, I., Anusha, K., Gupta, N., ... Kumar, A. (2016). Current and novel therapeutic molecules and targets in Alzheimer's disease. *Journal of the Formosan Medical Association*, 115(1), 3–10.

Kuruva, S.C.; Reddy, P. H. (2016). Amyloid beta modulators and neuroprotection in Alzheimer's disease: A critical appraisal. *Drug Discovery Today*. 22. 10.1016/j.drudis.2016.10.010.

Lee, H.E., Kim, D.H., Park, S.J., Kim, J.M., Lee, Y.W., Jung, J.M., Lee, C.H., Hong, J.G., Liu, X., Cai, M., Park, K.J., Jang, D.S., Ryu, J.H.. Neuroprotective effect of sinapic acid in a mouse model of amyloid  $\beta$ (1-42) protein-induced Alzheimer's disease. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* (2012) 103: 260-6.

Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., & Freret, T. (2013). Object recognition test in mice. *Nature Protocols*, 8(12), 2531–2537.

Lundkvist, J., Halldin, M. M., Sandin, J., Nordvall, G., Forsell, P., Svensson, S., ... Ekstrand, J. (2014). The battle of Alzheimer's Disease - the beginning of the future unleashing the potential of academic discoveries. *Frontiers in Pharmacology*, 5 MAY(May), 1–6.

Mehta, Ankita & Prabhakar, Mayank & Kumar, Puneet & Deshmukh, Rahul & Sharma, P.L.. (2012). Excitotoxicity: Bridge to Various Triggers in Neurodegenerative Disorders.. *European journal of pharmacology*. 698.

Meyer-Luehmann, M., Spires-Jones, T. L., Prada, C., Garcia-Alloza, M., de Calignon, A., Rozkalne, A., ... Hyman, B. T. (2008). Rapid appearance and local toxicity of amyloid- $\beta$  plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*, 451(7179), 720–724.

Minter, M. R., Taylor, J. M., & Crack, P. J. (2016). The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 136(3), 457–474.

Mortari, M. R. Atividade neurobiológica e caracterização química da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis* (Hymenoptera, Vespidae): identificação de peptídeos antinociceptivos e anticonvulsivantes. Tese (Doutorado em Psicobiologia). Universidade de São Paulo- Ribeirão Preto. 2007;

Müller, U. C., Deller, T., & Korte, M. (2017). Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(5), 281–298.

Musiek, E. S., and Holtzman, D. M. (2015). Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and ‘wingmen’. *Nat. Neurosci.* 18, 800

–806. doi: 10.1038/nn.4018

Nie Q, Du X, Geng M. Small molecule inhibitors of amyloid  $\beta$  peptide aggregation as a potential therapeutic strategy for Alzheimer’s disease. *Acta Pharmacol Sin.* 2011;32(5):545–51.

Niranjan, Rituraj. (2013). Molecular Basis of Etiological Implications in Alzheimer’s Disease: Focus on Neuroinflammation. *Molecular neurobiology*. 48.

Nisbet, R. M., Polanco, J. C., Ittner, L. M., & Götz, J. (2015). Tau aggregation and its interplay with amyloid- $\beta$ . *Acta Neuropathologica*, 129(2), 207–220.

Pedersen, W. A., Kloczewiak, M. A., & Blusztajn, J. K. (1996). Amyloid beta-protein reduces acetylcholine synthesis in a cell line derived from cholinergic neurons of the basal forebrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15), 8068–71.

Picken MM, Herrera GA. Thioflavin T stain: an easier and more sensitive method for amyloid detection. In: *Amyloid and Related Disorders*. Springer; 2012. p. 187–9.

Prokop, S., Miller, K. R., & Heppner, F. L. (2013). Microglia actions in Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathologica*, 126(4), 461–477.

Qiu, T., Liu, Q., Chen, Y. X., Zhao, Y. F., & Li, Y. M. (2015). A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40: similarities and differences. *Journal of Peptide Science*, 21(7), 522–529.

Querfurth, H. W., & Laferla, F. M. (2010). Alzheimer's Disease. *The New England journal of medicine*. 362. 329-44.(2010). *Alzheimer's Disease*, 329–344.

Quillfeldt, J. A. (2016). *Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research*, 271–311.

Revett, T. J., Baker, G. B., Jhamandas, J., & Kar, S. (2013). Glutamate system, amyloid  $\beta$  peptides and tau protein: Functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*.

Romeo, R. D., Mueller, A., Sisti, H. M., Ogawa, S., McEwen, B. S., & Brake, W. G. (2003). Anxiety and fear behaviors in adult male and female C57BL/6 mice are modulated by maternal separation. *Hormones and Behavior*, 43(5), 561–567

.

Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 8(e201606210), 1–14.

Selkoe, D. J., & Schenk, D. (2003). Alzheimer's disease: Molecular Understanding Predicts Amyloid-Based Therapeutics. *Annual review of pharmacology and toxicology* October, 43(1), 545–84.

Silva, J.; Monge-Fuentes, V.; Gomes, F.; Lopes, K.; Anjos, L.; Campos, G.; Arenas, C.; Biolchi, A. Gonçalves, J.; Galante, P.; Campos, L.; Mortari, M. (2015). Pharmacological Alternatives for the Treatment of Neurodegenerative Disorders: Wasp and Bee Venoms and Their Components as New Neuroactive Tools. *Toxins*. 7. 3179-3209. 10.3390/toxins7083179.

Siqueira, A.O., Mortari, M.R., Oliveira L., Gomes, R.O., Coutinho- Netto J, Ferreira, W. Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on chemically induced seizures and action on GABA and glutamate receptors. *Comp Biochem Physiol-C Toxicol Pharmacol.* 2005;141(1):50–7.

Small, D. H., & Cappai, R. (2006). Alois Alzheimer and Alzheimer's disease: A centennial perspective. *Journal of Neurochemistry*, 99(3), 708–710.

Soto C, Kindy MS, Baumann M, Frangione B. Inhibition of Alzheimer's amyloidosis by peptides that prevent  $\beta$ -sheet conformation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;226(3):672–80.

Soto C, Sigurdsson EM, Morelli L, Kumar RA, Castaño EM, Frangione B.  $\beta$ - sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med.* 1998;4(7):822–6.

Spangenberg, E. E., & Green, K. N. (2016). (2016). Inflammation in Alzheimer's Disease: Lessons learned from microglia-depletion models. *Brain, Behavior, and Immunity.* 61.

Sun L, Zhou R, Yang G, Shi Y (2017) Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the in vitro production of A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 peptides by  $\gamma$ -secretase. *Proc Natl Acad Sci USA* 114:E476–E485.

Tovote, P., Fadok, J. P., & Lüthi, A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(6), 317–331. doi:10.1038/nrn3945

Urbanc, Brigita & Cruz Cruz, Luis & Le, R & Sanders, J & Ashe, Karen & Duff, Karen & Stanley, H & C Irizarry, M & Hyman, Bradley. (2002). Neurotoxic effects of thioflavin S-positive amyloid deposits in transgenic mice and Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 99. 13990-5. 10.1073/pnas.222433299.

Van Dam, D., and Peter Paul De Deyn. "Animal Models in the Drug Discovery Pipeline for Alzheimer's Disease." *British Journal of Pharmacology* 164.4 (2011): 1285–1300.

Vaucher, E., Aumont, N., Pearson, D., Rowe, W., Poirier, J., & Kar, S. (2001). Amyloid  $\beta$  peptide levels and its effects on hippocampal acetylcholine release in aged, cognitively-impaired and -unimpaired rats. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 21(4), 323–329.

Vlad, S. C., Miller, D. R., Kowall, N. W., & Felson, D. T. (2008). Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology*, 70(19), 1672–1677.

Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2), 322–8.

Wang, Y., & Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group. 17, 5-21

Warburton, E. C., & Brown, M. W. (2015). Neural circuitry for rat recognition memory. *Behavioural Brain Research*, 285, 131–139.

Whyte, Lauren & M. Hemsley, Kim & Lau, Adeline & Hassiotis, Sofia & Saito, Takashi & Saido, Takaomi & J. Hopwood, John & Sargeant, Timothy. (2018). Reduction in open field activity in the absence of memory deficits in the App NL–G–F knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*. 336C. 177-181. 10.1016/j.bbr.2017.09.006.

Yamada, K., & Nabeshima, T. (2000). Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol Ther*, 88, 93–113.

Yun, H.M., et al. Neuroinflammatory and Amyloidogenic Activities of IL-32 $\beta$  in Alzheimer's Disease. *Molecular neurobiology* (2014): 1-12.

Brasília, 3 de novembro de 2015.



**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA AÇÃO NEUROPROTETORA DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS HOMÓLOGOS AO NEUROVESPINA NO MODELO MURINO DE DOENÇA DE ALZHEIMER.", UnBDoC n.º 131624/2015, sob responsabilidade da Professora Márcia Renata Mortari foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Mus musculus*: 30. A presente aprovação é válida pelo período de 3/7/2015 a 29/2017.



*ufpina*  
 Profa. Dra. Paula Dintz Galera  
 Coordenadora da CEUA

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



**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 20 de junho de 2017.

## DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE PEPTÍDEOS ISOLADOS DA PEÇONHA DE ARTRÓPODES PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER", Protocolo n.º 17/2017, sob responsabilidade da Professora Márcia Renata Mortari foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Mus musculus* (48 machos). A presente aprovação é válida pelo período de: 20/06/17 a 2º/2020.



Prof. Dra. Paula Diniz Galera  
Coordenadora da CEUA – UnB



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