

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE- UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE- PPGCS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

FABIO PACHECO BRANDT

**USO TERAPÊUTICO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO ASSOCIADAS
AO PEPTÍDEO INIBIDOR DE INTERLEUCINA-1 BETA EM UM
MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE ALZHEIMER**

CRICIÚMA, MARÇO DE 2025

FABIO PACHECO BRANDT

**USO TERAPÊUTICO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO ASSOCIADAS
AO PEPTÍDEO INIBIDOR DE INTERLEUCINA-1 BETA EM UM
MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE ALZHEIMER**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do
título de Doutor em Ciências da Saúde.
Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira.

CRICIÚMA, MARÇO DE 2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B821u Brandt, Fabio Pacheco.

Uso terapêutico de nanopartículas de ouro associadas ao peptídeo inibidor de interleucina-1 beta em um modelo animal de Doença de Alzheimer / Fabio Pacheco Brandt. - 2025.

87 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2025.

Orientação: Paulo Cesar Lock Silveira.

1. Nanopartículas de ouro - Uso terapêutico. 2. Interleucina-1beta - Uso terapêutico. 3. Alzheimer, Doença de - Tratamento. 4. Neuroinflamação. I. Título.

CDD 23. ed. 615.1

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 609 de 14.03.2019

PARECER

No dia 14 (quatorze) do mês de fevereiro de 2025, às 14 (quatorze) horas, na Sala 223/Bloco S, após o cumprimento legal de conclusão das disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado), realizaram-se a apresentação e a consequente defesa da tese intitulada: “**USO TERAPÊUTICO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO ASSOCIADAS AO PEPTÍDEO INIBIDOR DE IL1- β E AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM UM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE ALZHEIMER**”, do candidato **Fabio Pacheco Brandt**. A Banca examinadora foi composta pelos(as) professores(as): **Dra. Alexandra Ioppi Zugno** (Membro Relator – UNESC), **Dra. Gislane Zilli Réus** (Membro Interno – UNESC), **Dra. Lisiane Tuon Generoso** (Membro Externo – UNESC) e **Dr. Alexandre Pastoris Muller** (Membro Externo – UFSC). Após a apresentação, o candidato foi arguido pela Banca Examinadora, que assim expressou o resultado final da tese:

Trabalho aprovado

Trabalho não aprovado

Observações:

Criciúma, SC, 14 de fevereiro de 2025.

Documento assinado digitalmente
ALEXANDRA IOPPI ZUGNO
Data: 07/03/2025 19:06:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. ALEXANDRA IOPPI ZUGNO
Membro Relator – UNESC

Documento assinado digitalmente
GISLAINE ZILLI REUS
Data: 27/02/2025 13:47:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. GISLAINE ZILLI RÉUS
Membro Interno – UNESC

Documento assinado digitalmente
LISIANE TUON GENEROSO
Data: 24/02/2025 13:27:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. LISIANE TUON GENEROSO
Membro Externo – UNESC

Documento assinado digitalmente
Alexandre Pastoris Muller
Data: 24/02/2025 14:12:47-0300
CPF: ***.412.930-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. ALEXANDRE PASTORIS MULLER
Membro Externo – UFSC

Documento assinado digitalmente
PAULO CESAR LOCK SILVEIRA
Data: 24/02/2025 11:10:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. PAULO CESAR LOCK SILVEIRA
Orientador(a)

Documento assinado digitalmente
JOSIANE BUDNI
Data: 19/03/2025 11:45:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. JOSIANE BUDNI
Coordenadora Titular do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo ABNT, e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na Universidade do Extremo Sul Catarinense.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Criador pela dádiva da vida, por iluminar os caminhos e suas bênçãos diárias.

Agradeço aos meus familiares e amigos pelo apoio e permissão para subtração do bem mais valioso de todos, o tempo.

Agradeço, também, ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira, pelo aprendizado, por sua sabedoria e paciência, e a toda equipe do Laboratório de Fisiopatologia Experimental da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

"O Senhor é o meu pastor; nada me faltará" Salmo 23.1

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada por neurodegeneração progressiva cerebral, déficit cognitivo e alterações de memória, com aproximadamente 50 milhões pessoas com condição de DA atualmente, e com aumento progressivo da prevalência com o envelhecimento populacional, representando a quinta causa de morte no mundo. As manifestações patológicas da DA incluem a formação de placas β -amiloides (β A) extracelulares, devido à quebra progressiva da proteína precursora de amiloide (APP), fosforilação da proteína tau, com emaranhados neurofibrilares intracelulares, e neuroinflamação. Ressalta-se, também, o papel da citocina pró-inflamatória da interleucina-1 β (IL-1 β) na fisiopatologia da DA e o potencial terapêutico do bloqueio do receptor IL-1R1, com inibição da ativação do factor nuclear kappa B (NF- κ B) e da proteína-quinase ativada por mitógenos (MAPK), e consequente redução de diversas citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α). Ademais, o ouro na forma de nanopartículas (GNPs) possui propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, com supressão da produção mRNA para IL-6 e TNF α , além de boa disponibilidade para transporte pela barreira hematoencefálica (BHE). Como objetivo, avaliou-se o uso terapêutico de nanopartículas de ouro associadas ao peptídeo do inibidor de IL-1 β DAP1-2 sobre parâmetros comportamentais, inflamatórios e neuroprotetores em um modelo animal de doença DA. Neste experimento foram utilizados 70 camundongos Black-C57 (C57/BL6) machos, adultos, pesando entre 30 a 35g com 3 meses de idade, mantidos em condições ambientais padrão. O peptídeo ou líquido cefalorraquidiano artificial (ACSF) (400 pmol/ml) foi inoculado intracerebroventricular nos camundongos, e o tratamento foi iniciado 24 horas após. Os animais receberam o tratamento com GNPs via intranasal (25 μ g/mL) e DAP1-2 (1 μ g/ μ l), por 17 dias com intervalos de 48 horas. Os animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais (n=14): 1-ACSF; 2- β A₁₋₄₂; 3- β A₁₋₄₂+DAP1-2; 4- β A₁₋₄₂+GNPs; 5- β A₁₋₄₂+GNPs+DAP1-2. Nos dias 11 $^{\circ}$ e 12 $^{\circ}$ após inoculação os animais foram submetidos ao teste de campo aberto, no dia 13 $^{\circ}$ ao teste Y maze, e a partir do dia 14 $^{\circ}$ a 18 $^{\circ}$ ao teste do labirinto radial. Após os testes comportamentais, no dia 19 $^{\circ}$, todos os grupos foram eutanasiados para a coleta do córtex pré-frontal, hipocampo, fígado e posteriormente análises bioquímicas e histológicas. Na análise histológica e bioquímica de fígado não foi observado, em nenhum dos grupos experimentais, indícios de hepatotoxicidade. Nos testes comportamentais e laboratoriais foi demonstrado a eficácia dos compostos isolados ou associados, com efeito sinérgico potencializado no grupo β A₁₋₄₂+GNPs+DAP1-2, reduzindo os parâmetros inflamatórios, e melhorando o comportamento e os marcadores de neuroproteção, com aumento dos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), do fator de crescimento nervoso (NGF) e da interleucina-10 (IL-10), anti-inflamatória, e redução de IL-1 β , TNF α e da expressão gênica da APP. Em conclusão, o estudo demonstrou, de forma inédita, que as GNPs e o DAP1-2 melhoram os parâmetros comportamentais e bioquímicos do modelo experimental de DA, principalmente pelo efeito terapêutico sinérgico potencializado quando associados, podem representar alternativa terapêutica promissora na DA, principalmente reduzindo a neuroinflamação e a expressão gênica da APP.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; Neuroinflamação; Nanopartículas de Ouro; Peptídeo do Inibidor de IL-1 β ; DAP1-2.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is characterized by progressive brain neurodegeneration, cognitive deficits, and memory alterations. Currently, approximately 50 million people have AD, and its prevalence is increasing progressively with population aging. It is the fifth leading cause of death worldwide. Pathological manifestations of AD include the formation of extracellular β -amyloid (β A) plaques due to the progressive breakdown of amyloid precursor protein (APP), phosphorylation of tau protein, with intracellular neurofibrillary tangles, and neuroinflammation. The role of the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β) in the pathophysiology of AD and the therapeutic potential of blocking the IL-1R1 receptor, with inhibition of the activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK), and consequent reduction of several pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF α), are also highlighted. Furthermore, gold in the form of nanoparticles (GNPs) has anti-inflammatory and antioxidant properties, with suppression of mRNA production for IL-6 and TNF α , in addition to good availability for transport across the blood-brain barrier (BBB). The aim of this study was to evaluate the therapeutic use of gold nanoparticles associated with the IL1- β inhibitor peptide DAP1-2 on behavioral, inflammatory and neuroprotective parameters in an animal model of AD disease. This experiment involved 70 adult male Black-C57 (C57/BL6) mice, weighing between 30 and 35 g, 3 months of age, kept under standard environmental conditions. The β A₁₋₄₂ peptide or artificial cerebrospinal fluid (ACSF) (400 pmol/ml) was inoculated intracerebroventricularly into the mice, and treatment was initiated 24 hours later. The animals received treatment with GNPs intranasally (25 μ g/mL) and DAP1-2 (1 μ g/ μ L) for 17 days with 48-hour intervals. The animals were distributed into five experimental groups (n=14): 1-ACSF; 2- β A₁₋₄₂; 3- β A₁₋₄₂+DAP1-2; 4- β A₁₋₄₂+GNPs; 5- β A₁₋₄₂+GNPs+DAP1-2. On days 11 and 12 after inoculation, the animals were subjected to the open field test, on day 13 to the Y maze test, and from days 14 to 18 to the radial maze test. After behavioral tests, on day 19, all groups were euthanized for collection of the prefrontal cortex, hippocampus, and liver, and subsequent biochemical and histological analyses. In the histological and biochemical analysis of the liver, no evidence of hepatotoxicity was observed in any of the experimental groups. Behavioral and laboratory tests demonstrated the efficacy of the compounds alone or in combination, with a potentiated synergistic effect in the β A₁₋₄₂+GNPs+DAP1-2 group, reducing inflammatory parameters and improving behavior and neuroprotection markers, with increased levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF) and interleukin-10 (IL-10), anti-inflammatory, and reduced IL-1 β , TNF α and APP gene expression. In conclusion, the study demonstrated, for the first time, that GNPs and DAP1-2 improve the behavioral and biochemical parameters of the experimental AD model, mainly due to the potentiated synergistic therapeutic effect when associated, and may represent a promising therapeutic alternative in AD, mainly by reducing neuroinflammation and APP gene expression.

Keywords: Alzheimer's disease, Neuroinflammation, Gold nanoparticles, IL1- β inhibitor peptide, DAP1-2.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACSF – Líquido Cefalorraquidiano Artificial, do inglês: *Artificial Cerebrospinal Fluid*

APOE - Apolipoproteína E

APP - Proteína Precursora Amilóide, do inglês: *Amyloid Precursor Protein*

BACE 1 - Proteína Precursora Amilóide do Sítio ' β 1', do inglês: *Beta-site Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme 1*

BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro, do inglês: *Brain-Derived Neurotrophic Factor*

BHE - Barreira Hematoencefálica

DA - Doença de Alzheimer

DAMPs - Padrões Moleculares Associados a Danos, do inglês: *Damage Associated Molecular Patterns*

DCFH-DA - Diclorofluoresceína, do inglês: *Dichloro-Dihydro-Fluorescein Diacetate* DTNB - Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico), do inglês: *5,5'-Dithio-Bis-(2-Nitrobenzoic Acid)*

EDTA - Acido Etilenodiamino Tetra-Acético, do inglês: *Ethylenediaminetetraacetic Acid*

ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

GPX - Glutationa Peroxidase, do inglês: *Glutathione Peroxidase* GNPs - Nanopartículas de Ouro, do inglês: *Gold Nanoparticles* GSH - Glutationa reduzida, do inglês: *Glutathione (-SH)*

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês: *High-Performance Liquid Chromatography*

IFN- γ - Interferon Gama

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1, do inglês: *Insulin-Like Growth Factor 1*

IL-1 β - Interleucina 1 beta IL-4 - Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6 IL-10 - Interleucina 10

MAPK - Proteína cinase ativada por mitógenos, do inglês: *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MDA - Malondialdeído

MEC - Matriz Extracelular

NADPH - Adenosina Nicotinamina Fosfato Oxidase, do inglês: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen*

NF- κ B - Factor Nuclear Kappa B, do inglês: *Nuclear Factor-Kappa B* NGF - Fator de Crescimento Nervoso, do inglês: *Nerve Growth Factor* NO - Óxido nítrico, do inglês: Nitric Oxide

NTF - Emaranhados Neurofibrilares, do inglês: *Neurofibrillary Tangles* PAMPs -Padrões Moleculares Associados a Patógenos, do inglês: *Pathogen- Associated Molecular Pattern*

PPRs - Receptores de Reconhecimento de Padrões, do inglês: *Pattern Recognition Receptors*

SNC - Sistema nervoso central SOD - Superóxido Dismutase

TGF- β - Fator de Crescimento Transformador, do inglês: *Transforming Growth Factor Beta*

TLR - Receptores do tipo Toll, do inglês: *Toll-like Receptors*

TMB - Tetrametilbenzidina

TNF - Fator de Necrose Tumoral, do inglês: *Tumor Necrosis Factor*

β A - Peptídeo β -Amilóide

SUMÁRIO

_Toc192436510

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER	12
1.2 NEUROINFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA DE ALZHEIMER	16
1.3 NANOPARTÍCULAS DE OURO	22
1.4 PEPTÍDEO INIBIDOR DE IL1- β	26
2 OBJETIVOS	29
2.1 GERAL:.....	29
2.2 ESPECÍFICOS:	29
3 MATERIAL E MÉTODO	30
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	30
3.2 ANIMAIS	30
3.3 ADMINISTRAÇÃO β A ₁₋₄₂	30
3.4 TRATAMENTO.....	31
3.6 PEPTÍDEO DAP1-2	33
3.7 PREPARAÇÃO DO PEPTÍDEO DAP1-2.....	34
3.8 TESTES COMPORTAMENTAIS	35
3.8.1 Teste do campo aberto	35
3.8.2 Labirinto em Y (Y-maze)	35
3.8.3 Labirinto octogonal (Radial Maze)	36
3.9 EUTANÁSIA	36
3.10 HISTOLOGIA	37
3.11 IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO	37
3.12 RT-PCR	38
3.13 ENSAIOS BIOQUÍMICOS.....	38
3.14 OXIDANTES	38
3.14.1 DCFH-DA	38
3.14.2 Indicador da formação de óxido nítrico (NO)	39
3.15 MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS.....	39
3.15.1 Grupos sulfidril	39
3.15.2 Carbonilação de proteínas	39
3.16 DEFESAS ANTIOXIDANTES	40
3.16.1 Superóxido dismutase (SOD)	40
3.16.2 Glutathiona (GSH)	40
3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40

4 RESULTADOS	42
4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	42
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS GNPS	44
4.3 HISTOLOGIA	45
4.4 MARCADOR DE ERN E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	46
4.5 FATORES NEUROTRÓFICOS	48
4.6 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS	49
4.7 RT-PCR	51
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXO A.....	87

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada por neurodegeneração progressiva cerebral, déficit cognitivo e alterações de memória, representando importante causa de morbidade e mortalidade populacional, notadamente em pessoas idosas (Todd et al., 2013). Estima-se em aproximadamente 50 milhões de pessoas portadoras de DA atualmente e que crescerá significativamente nos próximos anos, com estimativas de aproximadamente 113 milhões de portadores de DA até 2050 no mundo (Knopman et al., 2021).

Levando em conta os estágios iniciais da demência, a quantidade de indivíduos com Alzheimer é consideravelmente maior do que o relatado na literatura disponível. As estimativas são não totalmente confiáveis, principalmente nos estágios iniciais da demência, onde há necessidade de médicos especialistas qualificados e estudos avançados de imagem de elevado custo ou biomarcadores (Gustavsson et al., 2023).

Desde sua descoberta em 1906, pesquisadores têm trabalhado para entender melhor a neuropatologia da Doença de Alzheimer (DA) e criar técnicas de diagnóstico para estratégias terapêuticas bem sucedidas para retardar ou interromper a progressão da doença (Leng et al., 2021). O aumento da prevalência da DA está entre as doenças do idoso de progressão mais lenta que afetam a qualidade de vida destes pacientes, sendo a quinta causa de morte no mundo (Kunkle et al., 2021).

As causas da DA não estão totalmente esclarecidas, apesar de extensa literatura científica sobre fisiopatologia e fatores de risco, mas é provável que seja o resultado de fatores genéticos e ambientais (Breijyeh et al., 2020). Sabe-se, atualmente, que a incidência se eleva significativamente após os 65 anos de idade, e progressivamente aumenta com o envelhecimento populacional (Tahami et al., 2022). Geralmente o declínio cognitivo começa com prejuízo na capacidade de formar memórias recentes, mas inevitavelmente afeta todas as funções intelectuais e levando à dependência completa para funções básicas da vida diária e morte prematura (Mayeux et al., 2012).

As manifestações patológicas da DA incluem placas amiloides (A β) extracelulares difusas e neuríticas, e emaranhados neurofibrilares intracelulares (NFTs) acompanhados por microgliose reativa, neurites distróficas e perda de neurônios e sinapses (Abubakar et al., 2022). Embora essas lesões patológicas não expliquem completamente as características clínicas da

doença, foi levantada a hipótese de que alterações na produção e processamento da proteína β -amiloide podem ser o principal fator desencadeante (Calabrò et al., 2021).

A placa $A\beta$ é formado devido à quebra progressiva da proteína precursora de amiloide (APP) pela ativação da β -secretase, enzima de clivagem de proteína precursora de amiloide do sítio ' β 1' (BACE 1), e a γ -secretase na via amiloidogênica (Kim et al., 2019). O aumento da concentração desses monômeros $A\beta$ extracelulares geram gradualmente por sua polimerização e agregação, as placas amiloides em núcleo denso (D'Onofrio et al., 2017).

A APP é uma proteína transmembrana que desempenha um papel substancial no desenvolvimento e crescimento de neurônios e fluxo axoplasmático anterógrado. Mais de 90% da APP são clivadas pela α -secretase no estado fisiológico normal, e os 10% restantes da APP estão sendo clivadas e processadas pelas β e γ -secretases, produzindo assim os peptídeos insolúveis $A\beta_{42}$ e $A\beta_{40}$ (Hernández-Zimbrón et al., 2014; Bettens et al., 2010).

A depuração e/ou agregação de $A\beta$ é muito dependente do alelo do gene APOE que codifica a apolipoproteína E, que funciona como carreador de lipídios (Yamazaki et al., 2019). Entre os quatro alelos do gene (APOE), o alelo APOE ϵ 4 está presente em 14,5% da população geral e 40% com DA de início tardio, enquanto o alelo Apo ϵ 2 raro (6,4% da população) pode ter um papel protetor para a DA (Ostendorf et al., 2020).

O processo detalhado da APOE no início da DA ainda não está bem estabelecido e necessita de pesquisas genéticas e bioquímicas mais amplas para desvendar seu papel (Ostendorf et al., 2020). Além disso, os estudos recentes também confirmaram que neuroinflamação, disfunção sináptica, disfunção mitocondrial, ativação microglial, astrogliose, perda de neurônios, danos na permeabilidade da barreira hematoencefálica, infecções virais, bacterianas e intestinais têm sido fatores substanciais responsáveis pela fisiopatologia da DA (Hartman e Ross, 2018).

Fatores de risco genéticos para a DA incluem mutações dominantes raras herdadas nos genes APP, PSEN1 e PSEN2, além de variações genéticas mais comuns, mas com penetração incompleta, como APOE. Em conjunto, as contribuições genéticas representam apenas uma parte modesta do risco atribuível, conforme se manifesta na idade de início da doença (Thambisetty et al., 2013).

A proteína tau também desempenham um papel vital no funcionamento fisiológico dos neurônios, pois causam a polimerização e estabilização dos microtúbulos, transporte de várias enzimas e outras organelas ao longo do citoesqueleto celular, além de promover o crescimento dos neurônios (Kovacs, 2018).

Tanto a fosforilação da proteína tau quanto a geração de placas A β estão envolvidas na fisiopatologia da DA, e são reguladas positivamente pelo estresse oxidativo (Abeyasinghe et al., 2020). A atividade proteolítica de BACE1 e a expressão de mRNA são aumentadas e associadas ao aumento da produção de vários biomarcadores oxidativos, por exemplo, o 4-Hidroxinonal (HNE) durante a hipóxia e outros agentes oxidantes (Guglielmotto et al., 2009).

A sinalização de BACE1 é regulada positivamente devido à ligação de produtos avançados de glicação (AGE) a seus receptores (RAGE), juntamente com a ativação da via de sinalização de factor nuclear kappa B (NF- κ B), que causa a transcrição e síntese de BACE1 juntamente com a geração de A β (Kuhla et al., 2015).

O diagnóstico da DA é predominantemente clínico, sendo facultado a utilização de métodos de diagnóstico por imagem, como ressonância nuclear magnética, tomografia por emissão de pósitrons, dentre outros, e laboratoriais, porém o diagnóstico definitivo de certeza é feito pós-morte por estudo anatomopatológico (McKhann et al., 2011).

O *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA), em 1984, desenvolveram um conjunto uniforme de critérios para permitir que médicos e pesquisadores mantivessem a consistência no diagnóstico, eles incluíram aspectos da história médica, exame clínico, testes neuropsicológicos e avaliações laboratoriais (McKhann et al., 1984). O diagnóstico presuntivo por critérios é feito através de uma anamnese minuciosa, exame físico e avaliação padronizada cognitiva (Dubois et al., 2021).

Dentre os critérios clínicos, é utilizado o mini-exame do estado mental (MEEM), composto de múltiplas questões clínicas totalizando 30 pontos, sendo sua interpretação dependente da escolaridade do entrevistado, e das alterações cognitivas como: afasias, alterações da linguagem; apraxia, capacidade prejudicada na execução de atividades motoras; agnosia, dificuldade de reconhecer ou identificar objetos, apesar de um funcionamento sensorial intacto; e alterações no funcionamento executivo (Folstein et al., 2020; Aprahamian et al., 2009).

Cabe destacar que a seletividade do envolvimento das estruturas cerebrais na doença de Alzheimer (DA) é singular, enquanto algumas áreas anatômicas estão comprometidas, as outras áreas adjacentes permanecem intactas (Kim et al., 2022). O hipocampo, uma das áreas cerebrais impactadas pela DA, apresenta uma rápida perda de tecido nos estágios iniciais, relacionada à desconexão funcional com outras partes do cérebro (Koval et al., 2021). À medida que a doença evolui, a atrofia das regiões temporal medial e hipocampal torna-se um marcante estrutural, com progressão tardia para o restante do cérebro (Rao et al., 2022).

Uma quantidade significativa de evidências epidemiológicas sugere, também, que o diabetes mellitus tipo 2 (DM2), obesidade e outros estados pré-diabéticos de resistência à insulina são fatores de risco para DA (Stoeckel et al., 2016) e distúrbios relacionados (MacKnight et al., 2002).

A resistência à insulina tem sido proposta como indutora de doenças neurodegenerativas através de uma série de mecanismos, incluindo a promoção de patologias específicas da doença, lesões vasculares e um aumento da vulnerabilidade neuronal e neurodegeneração em geral (De la Monte et al., 2012).

Relata-se que em um modelo animal para DM2, com camundongos transgênicos C57BL/6 expressando o gene mutante humano [A30P]AS, houve a promoção, o desenvolvimento e acumulação marcadores de DA, como placas A β , NFT e lesões de α -sinucleína (Rotermund et al., 2014). Estudos de neuroimagem mostram que o DM2 está associado com padrões de alterações cerebrais consistentes com demências neurodegenerativas, incluindo lesões na substância branca (Van Harten et al., 2006).

Apesar de não existir cura para a DA, há diversas opções de tratamento, farmacológicos e não-farmacológicos, que podem ajudar a retardar a progressão da doença e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Manter a aptidão cardiovascular, praticar atividades intelectuais regularmente e alimentação saudável podem contribuir para fortalecer a função cognitiva e reduzir o risco de DA. Sendo a predisposição genética para a doença considerada fator importante no seu desenvolvimento, como as mutações nos genes da APP, presenilina-1 (PSEN-1), presenilina-2 (PSEN-2) e apolipoproteína E (ApoE) (Breijyeh et al., 2020).

Atualmente, há um total de oito medicamentos disponíveis para o tratamento da doença de Alzheimer. Dentre eles, dois modificam a biologia subjacente da doença, contribuindo para retardar o declínio cognitivo e funcional em alguns pacientes. Um terceiro medicamento dessa categoria estava sendo avaliado para possível aprovação no momento da publicação. Além disso, seis medicamentos foram aprovados para o manejo dos sintomas da demência relacionada ao Alzheimer (Better et al., 2023).

Entre os medicamentos que podem reduzir os sintomas da DA, sem alterar a evolução da doença, estão os inibidores da acetilcolinesterase, que bloqueiam a degradação enzimática da acetilcolina, e os antagonistas do receptor N-metil D-aspartato (NMDA), que impedem a ligação do glutamato aos receptores NMDA, evitando a morte celular por hiperatividade neuronal. Os inibidores da acetilcolinesterase aprovados incluem donepezil, galantamina e rivastigmina, enquanto o único antagonista do receptor NMDA aprovado é a memantina (Selkoe et al., 2024).

Três desses medicamentos aprovados para uso clínico alteram a progressão da DA, aducanumab, donanemab e lecanemab, retardando o declínio cognitivo e funcional neurológico, sendo que o aducanumab teve sua fabricação descontinuada pelo fabricante por motivos não totalmente esclarecidos. Eles agem na remoção de placas A β e oligômeros A β do tipo protofibrilas. Estes medicamentos são anticorpos monoclonais contra estruturas A β , removendo placas amiloides cerebrais e modificando o curso da DA (Wang et al., 2024).

Os ensaios clínicos de lecanemab demonstraram uma redução moderada do declínio cognitivo e funcional em pacientes com comprometimento cognitivo leve ou demência associada à DA, nos quais possuem evidências de acúmulo de placas A β no cérebro, conforme determinado por meio de imagem funcional molecular cerebral ou análise do líquido cefalorraquidiano (LCR). É importante ressaltar que o lecanemab não é uma cura para a DA, sendo indicado apenas para pessoas com comprometimento cognitivo leve ou demência devido à DA (Wang et al., 2024; Madnani, 2023).

1.2 NEUROINFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA DE ALZHEIMER

Neuroinflamação é, de forma geral, definida como uma resposta inflamatória no sistema nervoso central, induzida por várias ações patogênicas, como infecção, traumatismo, isquemia e toxinas (Leng et al., 2021). Esse processo resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6, IL-18 e fator de necrose tumoral (TNF), quimiocinas incluindo CCL1, CCL5 e CXCL1, pequenas moléculas mensageiras como prostaglandinas e óxido nítrico (NO), além de espécies reativas de oxigênio, que são produzidas por células imunes inatas no SNC. Essas células são principalmente a microglia e os astrócitos, enquanto células endoteliais capilares e células sanguíneas infiltrantes também participam na reação (Thakur et al., 2023).

Por muitas décadas, o cérebro foi considerado um órgão privilegiado totalmente imune, mas esse conceito se desvaneceu e foi substituído por um modelo relativo de neuroinflamação envolvendo uma sofisticada resposta imune na DA. Outros distúrbios neurodegenerativos compartilham cascatas inflamatórias patogênicas comuns (Louveau et al., 2015).

Muitas vezes, a base é o envelhecimento inadequado de proteínas que se agregam em um padrão tridimensional específico da doença, que está associada a uma neuroinflamação significativa que contribui para o início e progressão da doença. Essa via patogênica também parece fundamental na DA (Knopman et al., 2021).

Em primeiro lugar, foi estabelecida uma forte ligação entre DA e a resposta imune inata com células microgлияis como seus principais atores no cérebro, uma vez que a micrógлия primariamente se localiza na vizinhança de placas amiloides ou neuríticas (Serrano-Pozo et al., 2011) e interagem com placas A β e NFTs extracelulares associados a DA (Cras et al., 1991; El Khoury et al., 1998).

A neuroinflamação foi originalmente vista como uma resposta passiva a essas deposições de proteínas, no entanto, pesquisas mais recentes indicam uma contribuição ativa de processos inflamatórios para patogênese da DA, com a contribuição também da resposta imune adaptativa, tornando a neuroinflamação outra marca registrada do DA (Heneka et al., 2015; Webers et al., 2020).

A microglia representa o principal sensor do sistema imunológico inato no cérebro, em repouso exibe uma morfologia ramificada e atividade de apresentação fraca de antígeno. Sobre ativação por dano tecidual ou patógenos, sua morfologia muda para uma forma ameboide, permitindo que eles migrem através do tecido neuronal com aumento da expressão de receptores que reconhecem neurotoxinas e a partir disso induzir a produção de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Leng et al., 2021).

A micrógлия é ativada por placas β A por meio de várias vias, que envolvem diversas moléculas e vias de sinalização, como Nrf2/NLRP3/NF- κ B/p38 MAPKs/GSK-3 β . Isso resulta na liberação de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6, contribuindo para a disfunção e morte das células do SNC (Liu et al., 2023). A micrógлия pode ser ativada também por fibrilas, lipopolissacarídeo (LPS) e outros, ao se ligarem aos receptores de reconhecimento de padrões (PPRs) (Leng et al., 2021).

É amplamente reconhecido que as micrógлияs são classificadas em diferentes estados de polarização com base em seus perfis imunofenotípicos: o M1 (pró-inflamatório ou classicamente ativado) e o M2 (anti-inflamatório ou alternativamente ativado). No entanto, existem evidências crescentes de que as micrógлияs apresentam uma diversidade muito maior do que essas duas categorias (Cai et al., 2022).

Em um cérebro de envelhecimento saudável, a microglia evolui para um fenótipo mais inflamatório, contribuindo assim para um ambiente inflamatório. Esta microglia ativada ou sensibilizada está na base de um ciclo vicioso de resposta pró-inflamatória contribuindo significativamente para neurodegeneração no cérebro com DA (Franceschi e Campisi, 2014; Norden e Godbout, 2013).

Além de participar de várias atividades fisiológicas críticas e funções como a integridade da barreira hematoencefálica (BHE) e a regulação do crescimento axonal e mielinização, os astrócitos também são importantes reguladores celulares do sistema imune inato (Leng et al., 2021). A astrogliose reativa também foi demonstrada no cérebro com DA, principalmente nas proximidades das placas amiloides (Medeiros e La Ferla, 2013).

Os astrócitos desempenham um papel crítico na metabolização das placas A β pelo processo de fagocitose e secreção de proteases degradantes de A β . A presença de placas de A β impactam os astrócitos, aumentando os níveis de cálcio e a atividade pró-inflamatória por meio da via RAGE/NF- κ B (Shareena et al., 2023). Foi proposto que o insulto inflamatório induz o fenótipo de astrócitos A1 através da via NF- κ B, enquanto a isquemia induz o fenótipo A2 por meio da via dos transdutores de sinal e ativadores da transcrição 3 (STAT3) (Liddelow et al., 2017).

Analogamente à microglia, os astrócitos liberam citocinas, interleucinas, NO e outras moléculas potencialmente citotóxicas após exposição a A β , exacerbando os processos neuroinflamatórios e liberando a proteína C3 do complemento que se liga ao C3aR neuronal (Jensen et al., 2013; Skaper et al., 2018). Interações recíprocas entre microglia e astrócitos desempenham um papel essencial tanto em processos fisiológicos cerebrais e neurodegenerativos (Bouvier e Murai, 2015).

Embora ambos os tipos de células gliais parecem contribuir para a neuroinflamação na DA, o momento e o mecanismo de seu envolvimento podem diferir substancialmente (Leng et al., 2021). As características celulares da microglia suportam um papel mais forte nos estágios iniciais da cascata neuroinflamatória, enquanto a expressão e liberação TNF α diferenciam daqueles recrutados precocemente da microglia, e poderiam iniciar uma onda de sinais complementares pela co-liberação de, por exemplo, espécies reativas de oxigênio (ERO) para iniciar vias reativas em astrócitos locais (Kreutzberg, 1996; Bouvier e Murai, 2015).

Microglia do fenótipo M1 produzem e liberam mediadores inflamatórios, como a óxido nítrico sintase induzível 2 (iNOS/NOS2), cicloxigenase-2 (COX-2), IL-1b, IL-6, IL-12, TNF α , CCL2, NADPH oxidase, integrinas, proteínas hidrolases, ROS e NO, causando neuroinflamação, danificando redes neuronais, inibindo a neurogênese e causando lesão à BHE (Dey et al., 2021). Além disso, as micróglia do tipo M1 induzem a proliferação de astrócitos, promovem a cicatrização glial, formam uma barreira ao redor dos axônios danificados, inibindo a extensão neuronal (Aili et al., 2023).

As micróglia do fenótipo M2 produzem e liberam citocinas anti-inflamatórias e fatores neuroprotetores, como arginase 2 (ARG2), fator de crescimento transformador- β (TGF- β), IL-

10, fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), CSF1, IL-6, fator de crescimento neurogênico (NGF), neurodistrofina e BDNF, que inibem as respostas inflamatórias, protegem os neurônios e promovem a neurogênese (Dey et al., 2021).

É importante mencionar, como indicador de ativação da micróglia, a molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizada 1 (Iba1), que é uma proteína específica para micróglia/macrófago. A Iba1 desempenha um papel na agregação de actina, além de participar do enrugamento da membrana e da fagocitose na micróglia ativada (Ohsawa K et al., 2004).

O envolvimento do sistema imunológico adaptativo nos distúrbios neurodegenerativos, como na DA, também pode ser presumido. Ativação e infiltração de linfócitos T periféricos no líquido cefalorraquidiano e no cérebro podem ser um importante fator de contribuição para a patologia da DA. Células T CD3+ infiltradas, principalmente do subtipo CD8+, foram descritas em humanos *post-mortem* no parênquima cerebral de pacientes com DA (Togo et al., 2002). Em contraste com a gliose e a presença de CD3+, as células T geralmente se correlacionam mais com neuropatologias correlacionadas com a proteína tau do que com placas amiloides (Merlini et al., 2018).

Além disso, subconjuntos de células T no líquido cefalorraquidiano e no sangue periférico mostram alterações patológicas. Linfócitos T auxiliares diminuídos, Th17 aumentados e níveis também aumentados de células T CD8+ foram dosados no sangue de pacientes com DA (Gate et al., 2020), enquanto a expansão clonal de células T CD8+ apresentadoras de antígeno, estavam presentes no líquido cefalorraquidiano de indivíduos com DA (Gate et al., 2020), indicativo migração de células T para o SNC.

O sistema imunológico adaptativo, assim como a resposta imune inata, pode estabelecer uma relação de 'amigo ou inimigo' na DA. Vários estudos baseados em modelos animais ilustraram que regulação controla a depleção de células T, pode ser neuroprotetora e mitigar a progressão da DA através da supressão de subconjuntos de células T prejudiciais e até mesmo a modulação da resposta microglial para estímulo de deposição de placas A β (Mayne et al., 2020).

Além dos processos inflamatórios locais, é bem estudada a correlação entre arteriosclerose e DA, e o efeito da inflamação sistêmica em ambas as patologias têm sido apresentadas nos últimos anos. Um conjunto crescente de evidências sugere que a inflamação sistêmica está associada ou precede a arteriosclerose (Durham et al., 2018). Além disso, ao nível do cérebro, a inflamação sistêmica, marcada por citocinas pró-inflamatórias circulatórias

elevadas, podem estimular uma resposta inflamatória cerebral, promovendo neurodegeneração e DA (Paouri e Georgopoulos, 2019).

A inflamação sistêmica demonstrou induzir declínio cognitivo e mudanças comportamentais (Sankowski et al., 2015). Estes achados levantam a questão se a inflamação sistêmica desempenha um papel compensatório, fisiológico ou talvez meramente um papel associativo na convergência com DA. O acúmulo de evidências experimentais e clínicas sugere que os peptídeos A β , A β 1-40 em particular, exercem propriedades com ação pró-inflamatória periférica e cerebral, tornando este um biomarcador inflamatório interessante (Visconte et al., 2018).

Além disso, o envelhecimento associado a proteína amiloidogênica tem sido correlacionado com o agravamento da inflamação cerebrovascular, notadamente pela disfunção endotelial (Younger et al., 2020). Foi sugerido, também, que a inflamação aumenta a produção de metilglioxal, um dicarbonil derivado da glicose, sendo que aumento dos níveis de metilglioxal pode exacerbar o declínio cognitivo, principalmente em pacientes diabéticos (Dhananjayan et al., 2017).

Elucidando os mecanismos subjacentes de ação dos biomarcadores acima mencionados pode ocorrer o cruzamento entre inflamação vascular e cerebral, sistêmica e local. No longo prazo, esse entendimento pode fornecer a base para novas abordagens terapêuticas anti-inflamatórias que tenham como alvo terapêutico a arteriosclerose e/ou DA (McKhann et al., 2011).

Apesar de ser a menor molécula sinalizadora gasosa, o NO é responsável por manter a homeostase em uma infinidade de tecidos e vias moleculares (Balaiya and Chalam, 2014) e desempenha um papel fundamental na patogênese da inflamação, embora tenha propriedades controversas (Sharma et al., 2007). Em condições normais fisiológicas, o NO exerce um efeito anti-inflamatório (Zhang et al., 2020), entretanto o NO também é considerado um mediador pró-inflamatório em condições patológicas, como na arteriosclerose (Chiba et al., 2019) e na DA (Stefano et al., 2020), principalmente devido à sua contribuição no estresse nitro-oxidativo (Pérez-Torres et al., 2020).

A geração de NO endotelial e/ou sua biodisponibilidade pode ser diminuída pelo aumento da geração de metabólitos do estresse oxidativo. Por si só, o estresse oxidativo contribui para a disfunção e pela rápida inativação oxidativa do NO e a produção excessiva de superóxido. Como resultado, a enzima óxido nítrico sintase 3 (eNOS) desacopla a atividade e a biodisponibilidade do NO diminui, criando um desequilíbrio redox, com formação de espécies

reativas de nitrogênio (ERN) e de ERO, e estresse oxidativo geral, que precede inúmeras patologias vasculares associadas a DA (Sena et al., 2013).

A ERO (superóxido, por exemplo) e ERN são formadas, dentre outras, por multi-subunidades da NADPH oxidase (NOX) e complexos de oxigênio molecular, usando NADPH como doador de elétron (Bai et al., 2022). Por muitos anos, pensou-se que a expressão de NOX ocorresse apenas na infiltração de monócitos/macrófagos e fagócitos, no entanto, a expressão de NOX também foi recentemente observada em componentes da parede vascular (Panday et al., 2015).

As substâncias típicas de defesa antioxidante incluem a superóxido dismutase (SOD), a glutatona (GSH), a glutatona peroxidase (GPX) e a catalase (CAT) (Vives-Bauza et al., 2007). A SOD regula o excesso de O_2^- na via endógena, convertendo-o em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é, em seguida, transformado em água pelas enzimas CAT ou peroxidase. Em condições fisiológicas, ERO, ERN e os antioxidantes são mantidos em homeostase, sendo as ERO e ERN neutralizadas quando geradas em excesso (Yu et al., 2024).

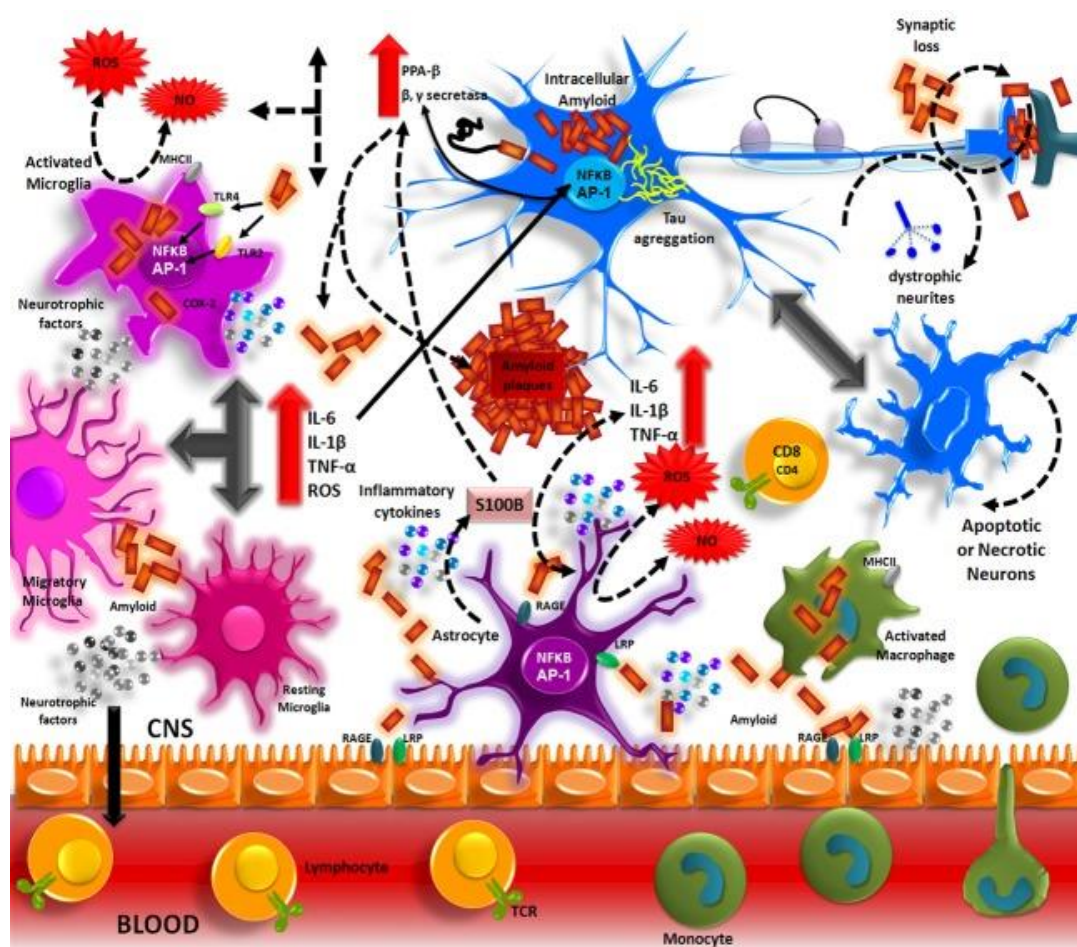


Figura 1: Neuroinflamação na doença de Alzheimer. O peptídeo A β produzido pelo processamento de APP, forma agregados que ativam a microglia e astrócitos por meio de TLRs e receptores RAGE. Esses receptores, por sua vez, ativam os fatores de transcrição NF- κ B e AP-1, que induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a expressão de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF). Fonte: adaptado de Meraz-Ríos et al., 2013.

Na DA, ERO são geradas principalmente via NOX2 na micróglia. A produção microglial aumentada de NOX2 está associada com incremento da neuroinflamação e deposição de placa amiloide (Simpson and Oliver, 2020). Neste contexto, à neuroinflamação tem sido atribuída, principalmente, a uma perda de integridade da barreira hematoencefálica (BHE) (Wardlaw et al., 2013). A BHE também serve como a primeira linha de defesa do cérebro, sendo um microambiente singular contra indutores patogênicos da circulação sanguínea sistêmica (figura 1) (Sweeney et al., 2019).

A diminuição da atividade da eNOS restaurou a permeabilidade da BHE, sugerindo que o NO derivado da eNOS é um fator importante para a patologia cerebrovascular demencial (Beauchesne et al., 2009). Esta resposta neuroinflamatória envolve a expressão alterada de junções aderentes em células epiteliais cerebrovasculares, levando também a uma perda de integridade da BHE e indução de angiopatia cerebral amiloide (CAA) (Carrano et al., 2012).

Mais especificamente, supõe-se que o principal fator causal da disfunção cerebrovascular, como visto na DA, é o estresse oxidativo com produção de ERO (Hwang and Kim, 2018). Sabe-se que a formação de ERO na presença de peptídeos A β reduz a biodisponibilidade de NO vascular cerebral (Austin e Katusic, 2020).

Dado ao seu efeito antiplaquetário e vasorelaxante, a redução da biodisponibilidade do NO, induz ao estresse oxidativo por NOX2 (Malkov et al., 2020), provavelmente promovendo hiperativação plaquetária e coagulação, o que piora o fenótipo pró-tromboembólico observado no cérebro e na microvasculatura de pacientes com DA (Bose et al., 2019). Além disso, sabe-se que plaquetas são uma fonte sistêmica de processamento de APP e, portanto, de geração de peptídeos A β (Foidl et al., 2020).

Ressalta-se que a IL-1 β é a principal ativadora do inflamossomo NLRP3. As placas A β levam ao aumento de pro-IL1- β para IL1- β madura na micróglia por meio da ativação de NLRP3 na presença de EROs, amplificando o processo neuroinflamatório (Gao et al., 2022). Há também evidências de que a inibição de IL1- β , conseqüentemente NLRP3, melhora amplamente a perda de memória espacial e reduz a deposição de A β em modelos murinos de DA (Heneka et al., 2013). Podendo o inflamossomo NLRP3 ser o mecanismo central da neuroinflamação na DA (Gao et al., 2022).

1.3 NANOPARTÍCULAS DE OURO

O ouro é utilizado há mais de 2000 anos para fins medicinais por diversos povos e culturas (Lou-Franco et al., 2021). Nos últimos anos, houve crescimento exponencialmente das

aplicabilidades do ouro coloidal por nanotecnologia através de nanopartículas de ouro (GNPs) na biologia e medicina (Paula et al., 2015).

As GNPs têm sido amplamente estudadas em virtude de seus efeitos promissores como antioxidantes e anti-inflamatórios, inibindo as vias de sinalização MAPK, NF- κ B, JAK/STAT, ERK-1/2, IKK- α/β e outras vias de sinalização, e ativando a sinalização AMPK/Nrf2, o que facilita o controle de respostas inflamatórias (Aili et al., 2023). Destaca-se a supressão da expressão NF- κ B por interação com a cisteína-179 do inibidor da subunidade beta da cinase kappa-B do fator nuclear (IKK- β), redução das citocinas pró-inflamatórias IL1- β , IL-6 e TNF- α , PEG2, NO, iNOS e COX-2, e também das ERO e ERN (Aili et al., 2023; Pinho et al., 2022).

Relata-se que a GNPs aumenta a expressão heme oxigenase-1 (HO-1), enzima de defesa antioxidante mediada por ativação de proteínas cinases ativadas por mitógeno p38 (P38 MAPK) e pelo fator nuclear eritroide 2-relacionado ao fator 2 (Nrf2), ou fator de transcrição redox-sensível. A ativação de Nrf2 por estresse oxidativo é regulada principalmente Keap1 (Kelch-like ECH associated protein 1), sendo a via de sinalização Keap1-Nrf2 uma das principais respostas protetoras ao estresse oxidativo e eletrofílico (Ko et al., 2020).

As GNPs também mostram eficácia na captura de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o ânion superóxido (O₂⁻), o que potencializa a atividade das enzimas antioxidantes, apresentando atividade similar à catalase, possivelmente por causa do estado de valência misto das GNPs (Nie et al., 2007). Estudos também indicam que as GNPs induziram mudança do fenótipo M1 (pró-inflamatório) para o fenótipo M2 (anti-inflamatório) de microglias e macrófagos, reduzindo a resposta inflamatória (figura 2) (Aili et al., 2023).

Elas apresentam propriedades únicas, como tamanho, distribuição, morfologia e funcionalização da superfície, além de características ópticas, eletrônicas, redox e catalíticas. A toxicidade das GNPs depende da dose, tamanho, forma e/ou carga de superfície da molécula, mas em regra, apresentam baixa citotoxicidade e alta capacidade de interação com as células, sendo, portanto, utilizadas clinicamente para otimizar o potencial dos medicamentos, modificando a farmacocinética, biodistribuição e absorção celular (Silveira et al., 2014).

Outra característica fundamental das GNPs para aplicação na área médica é a carga da superfície. A carga superficial, em conjunto com o tamanho e a forma, pode influenciar diretamente a eficiência e a absorção celular das GNPs. As GNPs podem apresentar carga positiva, negativa ou até serem isentas de carga. As GNPs com carga negativa tendem a ser menos tóxicas do que aquelas com carga positiva. Além disso, GNPs podem prejudicar a integridade da membrana celular, o que leva a um aumento da toxicidade (Pinho et al., 2022).

A superfície das GNPs pode ser facilmente modificada para se conectar a diferentes tipos de ligantes ou biomoléculas, dependendo da aplicação, o que assegura uma maior eficácia dessas nanopartículas. As modificações na química da superfície das GNPs, em conjunto com a adição de biomoléculas, podem melhorar significativamente a permeabilidade dessas partículas em células e tecidos, aumentando, assim, a eficácia das GNPs no tratamento e diagnóstico de doenças (Zhang et al., 2020).

É bem estabelecido que as GNPs reduzem as lesões cerebrais em modelo animal de DA, estabilizando as proteínas Tau e preservando a função mitocondrial no hipocampo e córtex cerebrais, modulam o estresse oxidativo e a resposta inflamatória, reduzindo o escape de citocromo C mitocondrial para o citoplasma e dos níveis de Caspase-3 ativadas (dos Santos et al., 2020).

As nanopartículas de ouro possuem penetração na BHE variável, a depender do tamanho das partículas, sendo que partículas menores que 30nm atravessam a BHE com maior facilidade. Este transporte é realizado principalmente por transcitose absorção-mediada (AMT) e transcitose receptor-mediada (RMT), associados a gasto de energia (Sela et al., 2015).

As GNPs, por apresentar características coloidais, quando administrado por via parenteral ou sanguínea, é rapidamente capturada pelas células do sistema monocítico-macrofágico, principalmente pelas células de Kupffer no fígado, reduzindo significativamente a disponibilidade para transporte na BHE (Säterborg et al., 1973; Raliya et al., 2017).

A presença da BHE limita o acúmulo de GNPs no SNC após administração intravenosa (IV) ou intraperitoneal (IP), sendo a via intranasal (IN) uma boa estratégia para contornar a BHE e reduzir toxicidade nas áreas não- alvo do restante do organismo, notadamente no fígado (Lochhead et al, 2012; Nance et al., 2022).

Cabe ressaltar, ainda, que a síntese verde de nanopartículas, como as GNPs reduzidas com curcumina (CUR), tem efeitos promissores e sinérgicos no controle da resposta inflamatória e do estresse oxidativo (Mendes et al., 2024). A CUR é capaz de controlar a resposta inflamatória diminuindo a atividade da via enzimática óxido nítrico sintase induzível (iNOS), lipoxigenase (LOX), fosfolipases A2 (PLA2s) e COX-2 que obstruem a síntese de prostaglandinas e leucotrienos pró-inflamatórios, e também exerce efeitos anti-inflamatórios por meio da modulação inibitória do inflamassoma NLRP3. GNPs e CUR têm uma alta tendência a aceitar elétrons e interagir com ERO para eliminá-los ou desativá-los, através do efeito scavenger (Casagrande et al., 2023).

A curcumina é um polifenol proveniente da planta túmerica (*Curcuma Longa L.*), também conhecida como açafrão da terra. A curcumina está atualmente sendo investigada por

suas possíveis e prováveis vantagens contra o câncer, doenças neurodegenerativas, inflamatórias e cardiometabólicas (Patel et al., 2020). A curcumina tem se destacado como um composto seguro, acessível e acessível que consegue atravessar a BHE, o que tem atraído pesquisadores para sua aplicação no tratamento de doenças neurodegenerativas (Mohammadi et al., 2022).

A curcumina tem demonstrado efeitos neuroprotetores em doenças neurodegenerativas, como a DA. Pesquisas indicaram que este composto diminuiu a síntese da proteína β A ao estimular a atividade de monócitos e macrófita (Wang et al., 2010; Khosravi et al., 2023). Portanto, a curcumina, ao inibir citocinas pró-inflamatórias como $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IL-6, IL-8 e COX-2, oferece benefícios terapêuticos ao diminuir as condições inflamatórias e regular a homeostase do SNC. Pesquisas mostraram que a curcumina proporciona proteção a várias células, incluindo astrócitos, neurônios e micróglia, além de diferentes áreas do Sistema Nervoso Central, como o hipocampo, o mesencéfalo, o córtex e a medula espinhal (Zhu et al., 2004; Ishrat et al., 2009).

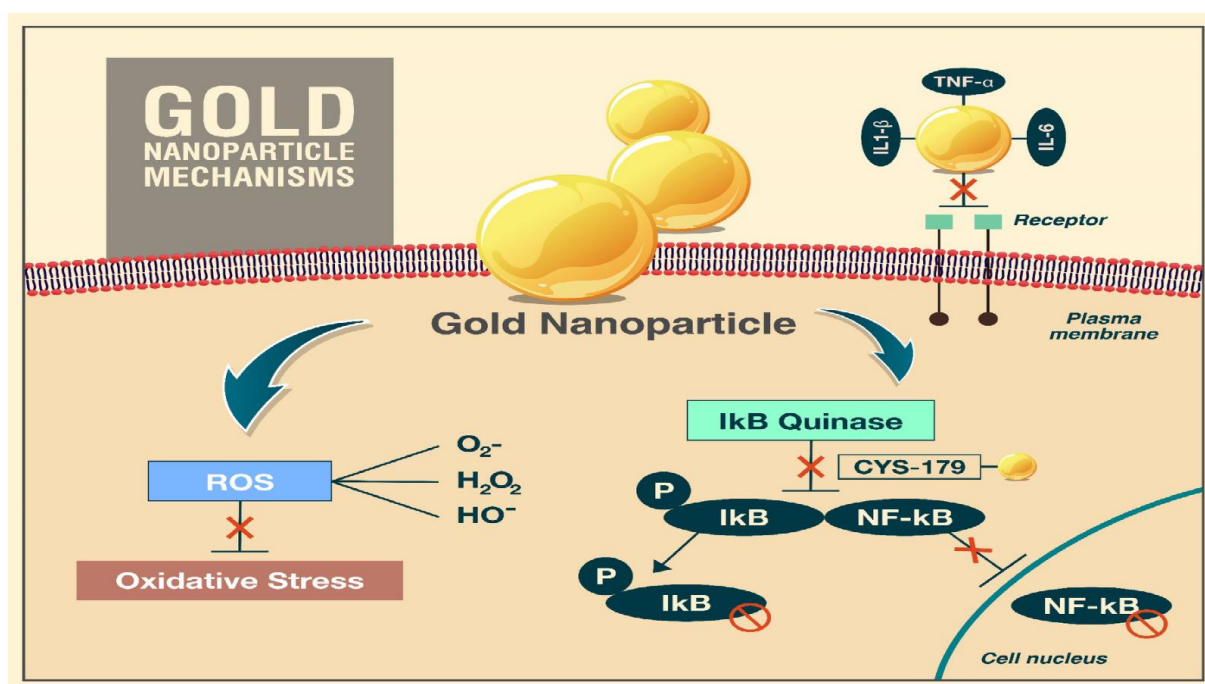


Figura 2: GNPs promovem efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes e interagem com diferentes moléculas, que sinergicamente reduzem o estresse oxidativo. A entrada de GNPs no ambiente celular inibe citocinas pró-inflamatórias circulantes, e interações com CYS-179 de IKK-B e subsequente inibição da via NF- κ B e amplificação da resposta inflamatória impactam a regulação do estresse oxidativo. Fonte: adaptado do Grupo de Pesquisa em Proteção e Reparo Tecidual da Universidade do Extremo Sul Catarinense (Unesc).

1.4 PEPTÍDEO INIBIDOR DE IL1- β

O peptídeo do inibidor de IL1- β (IL-1Ra) é uma molécula antagonista do receptor IL-1R1 que controla os níveis de IL-1 β ao se ligar ao receptor e impedir a ligação da IL-1 β , com inibição da ativação do NF- κ B e MAPK, e consequente redução de diversas citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF α , tornando-a um componente chave no controle do processo inflamatório (Retinasamy et al., 2023).

A IL-1 β foi identificada em 1977 e foi classificada como uma IL-1 de atividade específica reduzida. Apenas com o progresso tecnológico, a clonagem e o uso de IL-1 β recombinante, conseguimos compreender suas características biológicas. A IL-1 β é um membro da família IL-1, composta por 11 moléculas. Sete delas atuam como agonistas de receptores (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β e IL-36 γ), enquanto três atuam como antagonistas de receptores (IL-1RA, IL-36RA e IL-38), enquanto a IL-37 tem um efeito anti-inflamatório (Garlanda et al., 2013).

A função primordial da IL-1 β é estimular a ativação das células endoteliais, favorecendo o recrutamento e a adesão dos leucócitos. Isso ocorre através do aumento na expressão de moléculas de adesão no endotélio, juntamente com o estímulo à produção de quimiocinas, que estimulam a infiltração de células inflamatórias no espaço extravascular, contribuindo para o início do processo inflamatório. No entanto, ela não exerce esse papel isoladamente. A IL-1 β e o TNF têm um efeito sinérgico na inflamação, que também é estimulada pelo IFN através do incremento do TNF, sendo a via de sinalização da interleucina-1 β (IL-1 β) está associada à imunidade inata, com ativação de cascatas características de receptores do tipo *Toll-Like* e cascatas clássicas do NF- κ B e MAP quinases (Nosenko et al., 2019).

A superprodução de IL-1 β provoca um desequilíbrio na sinalização do sistema imunológico, fazendo com que a IL-1 β tenha um papel patogênico e agravante na fisiopatologia de diversas doenças inflamatórias, isso interrompe o processo de reparação, resultando em uma inflamação crônica e patológica, estimulando a ativação do inflamassoma nos macrófagos. O inflamassoma estimula ainda mais a liberação de IL-1 β , perpetuando um ciclo inflamatório por meio de um *feedback* positivo (Walle et al., 2014).

O IL-1R1 é este formado por três domínios (figura 3) e pode ser ativado também por PAMPs, que induzem inflamação, e por DAMPs. A ligação de uma molécula agonista ao receptor IL-1R1 provoca uma alteração conformacional, permitindo a ligação do co-receptor IL-1RAcP. Isso ativa a proteína de diferenciação mielóide 88 (MyD88), responsável por ativar a transcrição e transdução do precursor de IL-1 β (De-Pieri et al., 2024).

Quando uma molécula agonista do receptor IL-1R1 é conectada, ocorre uma alteração em sua conformação, possibilitando a conexão com o co-receptor IL-1RAcP. Depois de formar esse complexo (receptor/co-receptor), os domínios intracelulares são fosforilados, o que permite a ativação da proteína de diferenciação mielóide 88 (MyD88), que é encarregada de ativar a transcrição e a transdução do precursor de IL-1 β . Os precursores de IL-1 β estão localizados no citoplasma e nos lisossomos, e é imprescindível que esses precursores sejam clivados para produzir a IL-1 β em sua forma madura, que é a responsável pela ação biológica (figura 3) (Dinarello, 2018).

A caspase-1 cliva o precursor de IL-1 β , o transformando na sua forma ativa. A caspase-1 está presente na sua forma ativa somente dentro dos lisossomos. Para então desempenhar sua função no citoplasma, a caspase-1 na sua forma precursora, a pró-caspase-1, precisa ser clivada em caspase-1 pelo inflamassoma (De-Pieri, 2022). O inflamassoma consiste em um agrupamento de proteínas intracelulares que se unem às proteínas NALP3, originando o NALP3 Inflamassoma. Essa fusão só acontece quando há uma diminuição nos níveis de potássio intracelular, que é provocada por moléculas de ATP que ativam o receptor P2x7, abrindo os canais de potássio da célula (Abbate et al., 2020).

Quando os níveis de cálcio intracelular se elevam, a IL-1 β ativa é liberada para o ambiente extracelular por meio de microvesículas formadas pela membrana plasmática ou por liberação direta por meio de transportadores ou por piroptose. Portanto, para que ocorra a excreção da IL-1 β , é necessário um aumento de cálcio intracelular (Garlanda et al., 2013).

A compreensão aprofundada do papel biológico e patológico da IL-1 β e do seu receptor IL-1Ra, tornaram estes alvos terapêuticos de grande relevância. Ocorrendo progressos biotecnológicos significativos na indústria farmacêutica, fundamentados na inibição da atividade da IL-1 β (Dinarello e Van-Der-Meer, 2013). Um crescente corpo de evidências inferiu que impedir a sinalização da IL-1 farmacologicamente ou geneticamente em vários modelos de doença do SNC poderia reduzir a neuroinflamação ou retardar a progressão da DA (Luís et al., 2022).

Existem três medicamentos biológicos que foram aprovados para inibir a IL-1: Anakinra, uma forma recombinante da IL-1Ra; Rilonacept, que é uma proteína de fusão formada pelo complexo entre IL-1R1 e IL-1RAc; e Canakinumabe, um anticorpo monoclonal destinado a neutralizar a IL-1 β , porém estes apresentam alto custo de produção e estabilidade limitada (De-Pieri, 2022).

Ressalta-se que foi desenvolvido no Laboratório de Fisiopatologia Experimental da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, Brasil, de forma pioneira,

o peptídeo sintético DAP1-2, antagonista do receptor IL-1R1, que interage com os domínios 1 e 2 do receptor IL-1R1, suprimindo efetivamente a IL-1 β *in vitro* (De-Pieri, 2022). Este apresenta possíveis vantagens em relação aos demais IL-1Ra, como estabilidade, facilidade de produção e custo-benefício (De-Pieri et al., 2024; De-Pieri, 2022). Os primeiros estudos experimentais *in vivo* também demonstraram a eficácia do DAP1-2 em reduzir o processo inflamatório patológico (Zaccaron, 2021; Beirão, 2022).

Diante de todo exposto, justificam-se pesquisas com novos fármacos para o tratamento da DA, e acredita-se que o uso associado das nanopartículas de ouro com o peptídeo inibidor de IL-1 β DAP1-2 é capaz de desenvolver uma nova modalidade terapêutica no tratamento da DA, com efeitos principais na modulação da neuroinflamação, redução do estresse oxidativo e ação neuroprotetora por incremento de neurotrofinas.

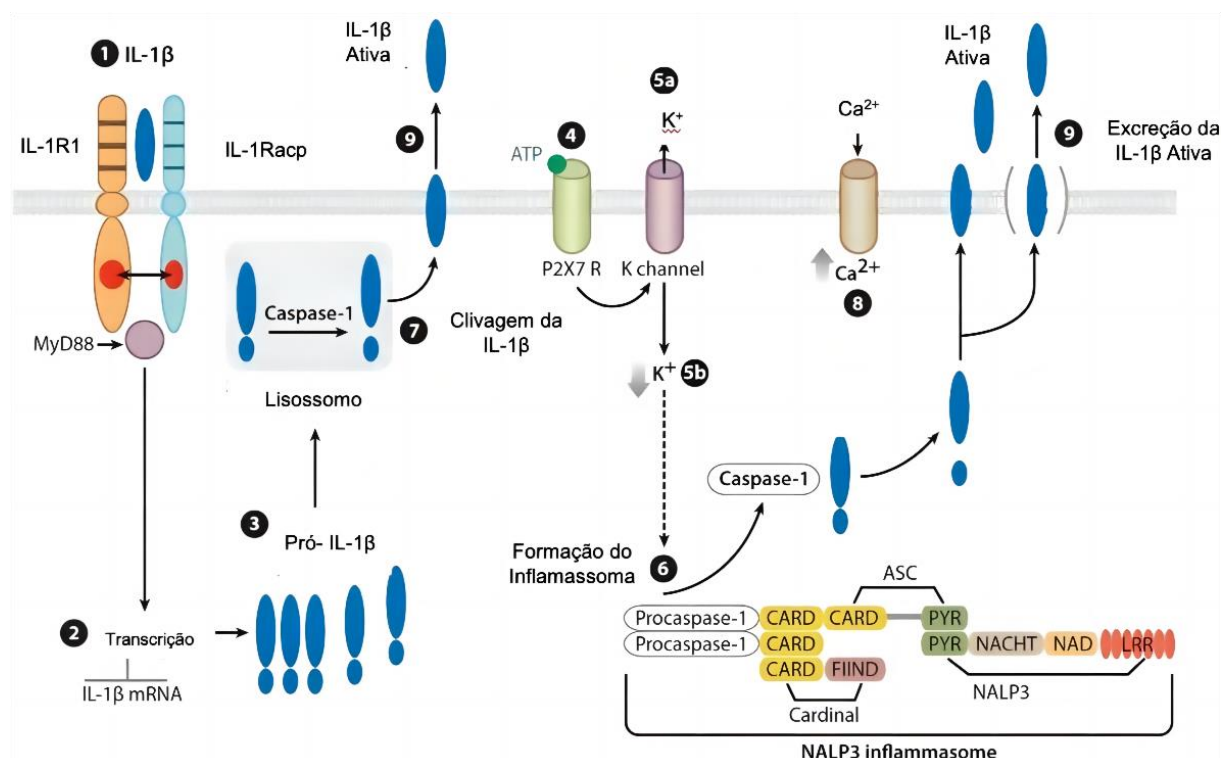


Figura 3: A molécula de IL-1 β ativa o receptor funcional IL-1R1, que recruta o co-receptor IL-1RAcP. Isso provoca uma fosforilação dos domínios intracelulares, atraindo a MYD88 (1). Esta é a responsável por iniciar a transcrição e a transdução dos precursores de IL-1 β (2 e 3). No lisossomo, os precursores da IL-1 β são clivados pela caspase-1 (7). No citoplasma, a ativação do NALP3 Inflamassoma é essencial para que a caspase-1 possa clivar os precursores de IL-1 β existentes no citoplasma (6 e 7). O NALP3 Inflamassoma é ativado por meio da redução do potássio intracelular, provocada pela abertura dos canais de potássio, devido à conexão de moléculas de ATP no receptor P2X7 (4, 5 e 6). Ocorre a ativação da IL-1 β quando se elevam os níveis de cálcio intracelular (8 e 9). Fonte: adaptado de De-Pieri, 2022 e Dinarello, 2018.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL:

Avaliar o uso terapêutico de nanopartículas de ouro associadas ao peptídeo inibidor da IL1- β sobre parâmetros comportamentais, inflamatórios e neuroprotetores em um modelo animal de DA.

2.2 ESPECÍFICOS:

- Avaliar a aprendizagem e memória espacial de curta e de longa duração em camundongos Black-C57 (C57/BL6) submetidos a administração do peptídeo βA_{1-42} , tratados com DAP1-2 e GNPs;
- Avaliar a memória de habituação de camundongos Black-C57 (C57/BL6) submetidos a administração do peptídeo βA_{1-42} , tratados com DAP1-2 e GNPs;
- Avaliar os níveis de citocinas e de fatores neurotróficos (TNF- α , IL-1 β , IL-10, TGF- β , BDNF, NGF) presentes no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos Black-C57 (C57/BL6) submetidos a administração do peptídeo βA_{1-42} , tratados com DAP1-2 e GNPs;
- Avaliar a expressão gênica de NF κ B, APP, IL-1 β e IBA-1 no hipocampo de camundongos Black-C57 (C57/BL6) submetidos a administração do peptídeo βA_{1-42} tratados com DAP1-2 e GNPs;
- Avaliar a produção de influxo de células inflamatórias, e os níveis de nitrito, DCF, carbonil, sulfidrilas, SOD e GSH, presentes no fígado de camundongos Black-C57 (C57/BL6) submetidos a administração do peptídeo βA_{1-42} , tratados com DAP1-2 e GNPs.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi submetido à Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, tendo todos os procedimentos em conformidade com as diretrizes brasileiras para o uso de animais com propósitos científicos e didáticos (Lei 11.794, DOU 27/5/13, MCTI, p.7) e aprovado sob o número do protocolo 88/2023 no dia 12 de fevereiro de 2024. (Anexo A). Esta pesquisa também seguiu as Diretrizes ARRIVE 2.0 (Percie du Sert et al., 2020).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 70 camundongos Black-C57 (C57/BL6) machos, adultos, pesando entre 30 a 35g com 3 meses de idade (90 dias) provindos da colônia de reprodução do Biotério da UNESC. Os animais foram alocados em grupos de até 05 camundongos por caixa moradia, com acesso à ração e água potável ad libitum (exceto para os dias nos quais foram realizados testes comportamentais que necessitam de racionamento de alimento), mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas (06:00 às 18:00) e em temperatura de 23 ± 1 °C. Os animais foram distribuídos randomicamente em 5 grupos experimentais com ‘n’ de 14 animais por grupo para análises bioquímicas, moleculares e testes comportamentais.

- Grupo 1 - Líquido cefalorraquidiano artificial (ACSF) (4 μ L);
- Grupo 2 - β A1–42 (400 pmol);
- Grupo 3 - β A1–42 + peptídeo DAP1-2 (β A1–42+DAP1-2) (1 μ g/ μ l);
- Grupo 4 - β A1–42 + nanopartículas de ouro (β A1–42+GNPs) (25nm, 25 μ g/mL);
- Grupo 5 - β A1–42+DAP1-2+GNPs.

3.3 ADMINISTRAÇÃO β A₁₋₄₂

O peptídeo β A₁₋₄₂ (Tocris Bioscience, Bristol, UK) foi dissolvido numa solução de tampão fosfato (NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,5) na concentração de 1 μ g/ μ L. A solução foi incubada durante 7 dias em estufa a 37 °C e 5% de

CO₂ para permitir a agregação dos peptídeos β A₁₋₄₂ em oligômeros (Ueda et al., 1994; Resende et al., 2008; Ruiz-Muñoz et al., 2011). Após a agregação a solução foi armazenada a -20 °C até a sua utilização. No dia da administração a solução foi diluída na dose final de 100 pmol/ μ L em líquido cefalorraquidiano artificial (ACSF) (NaCl 24 mM, KCl 2,5 mM, MgSO₄ 2,0 mM, KH₂PO₄ 1,25 mM, 26 mM de NaHCO₃, glucose 10 mM e sacarose 4 mM).

Os animais foram submetidos à injeção dos agregados β A₁₋₄₂ ou ACSF que foram injetados no ventrículo lateral esquerdo a uma concentração de 400 pmol/ μ L, com volume de 4 μ L unilateralmente no ventrículo. As micro injeções foram efetuadas utilizando uma seringa Hamilton de 10 μ L acoplada a uma agulha de aço inoxidável de calibre 28, com 3 mm de comprimento. A agulha foi inserida diretamente através da pele e do crânio no ventrículo lateral, orientada pela visualização de um triângulo equilátero entre os olhos e o centro do crânio para localizar o bregma (Laursen e Belknap, 1986; Gomes et al., 2013). Após o término da injeção, com duração de aproximadamente 30 segundos, a máscara de isoflurano foi retirada de forma que os animais acordem imediatamente. Os camundongos Black-C57 (C57/BL6) machos com 3 meses passaram pelo procedimento, onde foi administrado o peptídeo, e um dia após a realização do procedimento foram tratados por 17 dias com DAP1-2 (1 μ g/ μ l) e GNPs (25 μ g/mL) via intranasal divididos conforme seus tratamentos.

3.4 TRATAMENTO

Para cada aplicação de DAP1-2 e GNPs, os ratos foram anestesiados com isoflurano à 4% e mantidos anestesiados com a mesma solução. O tratamento foi realizado em dias intercalados (dia sim, dia não) por 17 dias e a primeira sessão de tratamento foi realizada 24h após a administração do peptídeo β A₁₋₄₂, conforme descrito na figura 4.

Os grupos β A₁₋₄₂+DAP1-2, β A₁₋₄₂+GNPs e β A₁₋₄₂+GNPs+DAP1-2 receberam 25 μ g/mL de GNPs e/ou 1 μ g/ μ l de DAP1-2 via intranasal (7 μ l por narina). O grupo ACSF recebeu apenas ACSF. Todos os tratamentos foram realizados em dias intercalados, um dia sim e um dia não.

Todos os procedimentos foram realizados por pessoas treinadas em manusear camundongos Black-C57 (C57/BL6) e por técnicos do biotério da Unesc.

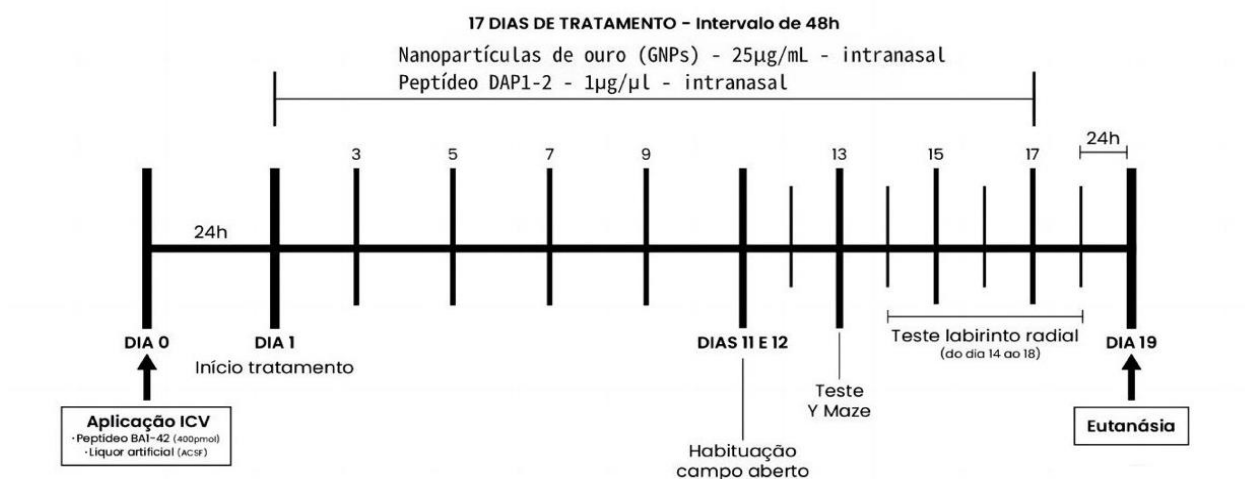


Figura 4 - Linha do tempo experimental. Fonte: elaborado pelo autor.

3.5 SÍNTESE VERDE COM CURCUMINA DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

As GNPs obtidas pela redução foram de uma solução estoque de extrato Curcuma longa que foi preparada em etanol absoluto (3mg/ml). Um miligrama de solução de curcumina foi adicionado em 49 ml de água deionizada. Soluções de estoque de ácido cloroáurico (HAuCl₄ 4 mM), foram preparadas em água Milli Q. Na sequência, uma solução pré- definida de extrato foi adicionado em água Mili Q e mantida sob agitação e aquecimento até atingir a temperatura de 90 °C. Hidróxido de sódio (NaOH) (0.1 M) foi usado para ajustar o pH entre 10 e 11. Na sequência, uma solução 1 mM de HAuCl₄ foi adicionada gota a gota sob agitação simultânea. A reação foi mantida sob agitação até atingir a temperatura ambiente e posterior formação das GNPs. A solução apresentou uma cor rubi-alaranjada. As soluções de GNPs foram caracterizadas por espectroscopia ultravioleta-visível (UV- Vis), em um modelo SpectraMax Plus. As nanopartículas foram medidas na região do visível (390–700 nm). O tamanho e morfologia das nanopartículas foram definidas por Casagrande (2023) utilizando microscopia eletrônica de transmissão (TEM) usando um JEM-1011 (100 kV). Uma gota da solução das nanopartículas foi adicionada a uma grade de cobre (300 mesh) coberta com uma fina camada de carbono. A secagem foi realizada em temperatura ambiente (24 h) e posteriormente as imagens foram obtidas. O tamanho hidrodinâmico e a carga superficial em pH 7,4 (25 °C) foram investigados através de medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta, usando um Zetasizer Nano ZS. As soluções de nanopartículas foram colocadas em uma célula capilar dobrada. Todas as análises foram realizadas em triplicata, para obtenção da média e

desvio padrão (DP). A estabilidade das soluções foi avaliada por espectroscopia UV-Vis e Zetasizer.

3.6 PEPTÍDEO DAP1-2

Foi utilizado o peptídeo DAP1-2, um antagonista dos domínios 1 e 2 do receptor de IL-1 β . DAP1-2 foi desenhado através de ferramentas de bioinformática, com base nos aminoácidos-chave da molécula IL-1Ra que são conhecidos por interagir com os resíduos dos domínios 1 e 2 do receptor IL-1R1. O design do peptídeo visou bloquear a interação entre a IL-1 β e seu receptor, com o intuito de diminuir a sinalização inflamatória (De-Pieri et al., 2024). O desenvolvimento e a síntese química do peptídeo DAP1-2 foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa em Biotecnologia Aplicada do Laboratório de Fisiopatologia Experimental – UNESC.

A síntese dos peptídeos foi realizada manualmente utilizando aminoácidos específicos para síntese *in vitro*, a partir do protocolo Fmoc-Sínteses (Merrifield, 1965; Machado-De-Ávila et al., 2014). O protocolo Fmoc-Sínteses consiste em fixar o aminoácido C-terminal do peptídeo sobre um suporte sólido insolúvel e depois alongar a cadeia peptídica com a adição de sucessivos resíduos da porção C-terminal para N-terminal. Esses aminoácidos possuem um grupamento amina protegido pelo grupamento fluorenil- metil-oxicarbonila (Fmoc) e sua cadeia lateral também é protegida para evitar possíveis reações indesejadas.

A síntese foi realizada em uma seringa de 6 mL com um filtro de polietileno hidrofóbico, contendo o suporte sólido (resina rink) e se inicia com a adição de dimetilformamida (DMF) por 30 minutos. Em seguida, é adicionada a 4-metilpiperidina 25% em DMF em dois ciclos de desproteção, incubando a solução na seringa por 5 e 15 min para remover o grupo Fmoc da resina, e então foram realizadas três lavagens com DMF e uma com diclorometano (DCM). Para verificar o resultado, é realizado o teste de azul de bromofenol, para isso é retirado alguns grãos de resina da seringa e adicionado azul de bromofenol 0,1% em DMF, que confirma a desproteção do aminoácido, representado pela mudança para cor azul dos grãos de peptídeo-resina.

O primeiro resíduo de aminoácido, da porção C-terminal, é ancorado por meio de seu grupo ácido carboxílico na resina rink. O grupo Fmoc é removido por 4-metilpiperidina 25% em DMF em dois ciclos de desproteção, incubando a solução na seringa por 5 e 15 min. Após essa etapa de desproteção, foram feitas três lavagens com DMF e uma lavagem com DCM. O acoplamento do primeiro aminoácido à resina é realizado por ativação do grupo carboxílico,

com os reagentes de acoplamento, DIC (N, N-diisopropilcarbodiimida) e Oxyma (etil 2-ciano-2-(hidroxiimino)acetato), que foram utilizados para diluir o aminoácido e então essa solução é colocada na seringa por trinta minutos. Em seguida, é realizado quatro lavagens com metanol e DMF de forma intercalada, e por fim uma última lavagem com DCM.

Entre todos os ciclos de desproteção e acoplamento, uma etapa de controle colorimétrico de desproteção e acoplamento é realizada usando azul de bromofenol 0,1% em DMF. Quando o terminal N é desprotegido, a cor do peptídeo-resina é azul e, quando protegido, é amarela. Os ciclos de desproteção e acoplamento foram realizados até que toda a cadeia peptídica seja sintetizada por sucessivas ligações peptídicas, que acoplam os resíduos de aminoácidos da região C-terminal em direção a região N-terminal.

Após o último aminoácido ser acoplado, é realizado o último ciclo de desproteção, dando fim aos ciclos de acoplamento dos aminoácidos. Após o último ciclo de desproteção, o peptídeo é removido da resina, por uma etapa chamada de clivagem. Na qual, acontece a eliminação dos grupamentos protetores da cadeia lateral e a clivagem da cadeia peptídica da resina, ou seja, separando a cadeia peptídica do suporte sólido. Para isso, o peptídeo foi incubado por três horas com uma solução de clivagem contendo 2,5 % de trietilsilano, 2,5 % de água destilada, 2,5 % de 1,2-etanoditiol e 92,5 % de ácido trifluoracético.

Após esse período, a solução de clivagem foi filtrada e recolhida em um tubo tipo Falcon. Em seguida, é adicionado 15 mL de éter etílico gelado (4 °C), para ocorrer a precipitação do peptídeo, então essa solução é congelada overnight (-20 °C). No dia seguinte, foi realizada a centrifugação dessa solução por 10 minutos a 4 °C a 10.000 rpm, após o processo foi descartado o sobrenadante. Em seguida, foi adicionado novamente éter etílico gelado no peptídeo (o precipitado) e outro ciclo de centrifugação nas mesmas condições, foi realizado. O sobrenadante é descartado, e permanecerá somente o precipitado, ou seja, o peptídeo sintetizado.

Os peptídeos sintetizados foram liofilizados, passando pelas etapas, de congelamento em nitrogênio e liofilização em uma pressão de 80 mmHg com o condensador mantido a - 100 °C por 24 horas, ou até completa liofilização.

3.7 PREPARAÇÃO DO PEPTÍDEO DAP1-2

Para a utilização dos peptídeos liofilizados nos ensaios, foi necessário realizar a diluição do mesmo. Para isso, foi pesado 1 mg de cada peptídeo e diluído em 1 mL de PBS (Tampão Fosfato Salino), estabelecendo uma concentração final de 1 mg/mL, para as soluções estoque

de cada peptídeo. As soluções testes na concentração de 5 µg/mL foram preparadas através da diluição das soluções estoques em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). A concentração testada, foi estabelecida de acordo com dosagens utilizadas em trabalhos, que utilizaram o medicamento Anakinra em ensaios de cultura celular (Hueston et al., 2019) e trabalhos anteriores com outros peptídeos e cultura de células, desenvolvidos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa.

Para o presente estudo, o peptídeo DAP1-2 foi diluído através de duas preparações distintas, sendo diluído em nanopartículas de ouro reduzidas com curcumina e em água mili-Q. A concentração final do peptídeo em ambas as preparações foi ajustada para 1 µg/µl.

3.8 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.8.1 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi utilizado para investigar a atividade locomotora, a memória espacial de longo prazo e a memória de trabalho dos animais, com $n = 70$ (Prut e Belzung, 2003; Gillfeldt, 2006). O aparelho feito de acrílico transparente com assoalho cinza foi dividido por linhas pretas em 25 quadrados (10 x 10 cm) e cercado por paredes elevadas em 40 cm de altura. Cada camundongo foi colocado no centro do campo aberto e o número total de cruzamentos registrado por 5 minutos. Um cruzamento é registrado quando o animal atravessa um quadrante com as quatro patas. O piso do campo aberto é dividido em 12 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual tiveram 5 minutos para explorar livremente o ambiente. Imediatamente após, os animais voltaram para a caixa moradia e para o biotério. Foram medidos os números de “cruzamentos” que o animal realizou através das linhas pretas da caixa, para avaliar a locomoção destes animais (Wang et al.; Salehi-Sadaghiani et al., 2012).

3.8.2 Labirinto em Y (Y-maze)

Esse teste avalia a memória operacional (working memory) e o aprendizado, com $n = 70$. O labirinto em Y consiste de uma caixa acrílica com 2mm de espessura, altura 34,5 cm, com cada braço medindo 75,5 cm de comprimento e 11,7 cm de largura. Neste teste, o animal foi colocado em um braço e alternou espontaneamente as entradas nos outros braços durante 8 minutos. Todas as entradas em cada braço foram sequencialmente anotadas, assim o número

total de entradas em cada braço, bem como a sequência de entradas, foi registrado. As informações foram analisadas para determinar o número de entrada do braço sem repetição. Os dados foram expressos como a porcentagem de alternância nos braços sem repetição. O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos grupos controle, indicando que os animais se lembraram em qual braço eles entraram por último. O resultado foi expresso em porcentagem e obtido através de uma fórmula matemática (alternações espontâneas % = n° de acertos/total - 2 X 100).

3.8.3 Labirinto octogonal (Radial Maze)

O animal foi colocado no aparato do labirinto octogonal, um aparato de 8 braços, numerados de 1 a 8 (48 × 12 cm), que se estende radialmente a partir de uma área central, com $n = 70$ (32 cm de diâmetro). O aparelho é colocado 50 cm acima do chão, e tem formas geométricas posicionadas na reta do braço onde é colocada a comida, estas pistas podem ser no final do braço. Dessa forma o animal foi colocado neste aparelho durante 5 minutos no primeiro dia de teste apenas para se habituar ao aparato, após retornou a caixa moradia e foi colocado aproximadamente 2 *fruity loops* por animal para se habituarem a comida e depois ficaram 22 horas sem ração. No segundo dia de teste ou 19^o de tratamento o animal foi colocado novamente no aparato, porém, já havia comida (*fruity loops*) em quatro dos oito braços do labirinto, nos braços em que há comida tem pistas geométricas ao final dos braços. Foi anotado a entrada em cada braço, assim como, medido o tempo que cada animal demora para encontrar os 4 *fruity loops*, assim que o animal encontrou as 4 recompensas foi retirado do aparato e retornou a caixa moradia. Após o retorno a caixa moradia, os animais receberam a ração do biotério e tiveram a ração durante 2 horas disponível para alimentarem-se, após foi colocado novamente 2 *fruity loops* por animal e a ração do biotério foi retirada, assim os ratos ficaram em jejum durante as 22 horas subsequentes. O mesmo foi realizado no 20^o, 21^o dia de tratamento e 24 horas após o último tratamento no 22^o dia os animais foram submetidos à eutanásia.

3.9 EUTANÁSIA

Imediatamente após o último teste comportamental, os animais foram submetidos a eutanásia, por decapitação na guilhotina, com $n = 70$. Os animais ficaram aguardando a eutanásia na sala ao lado da sala de eutanásia para evitar que sentissem o cheiro do sangue. A guilhotina foi lavada em água corrente entre cada eutanásia. O córtex pré-frontal, hipocampo e

fígado foram dissecados para posteriores análises bioquímicas e moleculares (n = 70), e, portanto, armazenados em freezer -80 °C. Após a eutanásia os animais foram acondicionados em saco branco leitoso e encaminhados para freezer (conservação) na própria universidade.

3.10 HISTOLOGIA

As amostras teciduais do fígado foram embebidas em solução de paraformaldeído (PFA) a 10% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) por 24 horas, com n = 70. Posteriormente incluídas em parafina após desidratação e clareamento, e seccionadas em cortes de 5 µm de espessura. Através da coloração de hematoxilina-eosina (H&E) foi possível quantificar o infiltrado considerando a coloração nuclear de células inflamatórias (H&E). Os dados foram expressos como densidade óptica (OD).

3.11 IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO

A fim de determinar-se a concentração de citocinas inflamatórias nos tecidos de interesse, foi realizado o imunoenensaio de imunabsorbância enzimática - ELISA sanduiche indireto (DuoSet ELISA) utilizando amostras das estruturas avaliadas em duplicatas, com n = 70. As amostras foram primeiramente homogeneizadas em tampão de lise com inibidores de proteases, com o intuito de preservar o conteúdo proteico da amostra de interesse. Com as amostras devidamente preparadas, as placas de ELISA foram sensibilizadas com um anticorpo de captura específico (diluição 1:100), deixando overnight a 4 °C. No dia posterior, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (Tween 20 e NaCl), bloqueadas (ELISA / ELISPOT Diluent) e incubadas por uma hora a temperatura ambiente. As amostras dos tecidos de interesse foram então pipetadas em duplicata na placa (100 microlitros), sobre seus respectivos anticorpos de captura. Após duas horas de incubação, as placas passaram novamente pela etapa de lavagem, a fim de remover-se as ligações inespecíficas. Posteriormente, foi adicionado o anticorpo de detecção, o qual se liga aos antígenos da amostra formando assim um “sanduiche” de anticorpo e amostra. Após período de incubação à temperatura ambiente e posterior etapa de lavagem, foi adicionado 100 microlitros de uma solução contendo uma enzima peroxidase (HRP). Sob esta solução, adicionou-se um substrato cromogênico, o tetrametilbenzidina (TMB), a qual em presença da HRP emite uma coloração azul específica. Para parar esta reação, utilizou-se 50 µ por poço de ácido sulfúrico diluído. A concentração das citocinas inflamatórias

(IL-1 β , TNF- α , IL-10 e TGF- β) e fatores neurotróficos como (BDNF e NGF) foram determinadas via leitura da absorbância (450 nm) em espectrofotômetro (BIO-RAD, 680).

3.12 RT-PCR

A análise de expressão gênica de NF κ B, APP, IL-1 β e IBA-1 foram realizadas através de PCR – Real Time, com n = 70. O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol® Technologies e seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. O RNA obtido foi solubilizado em 30 μ l de água Milli-Q tratada com DEPC 0,1% (Sigma), agrupado em um único tubo e armazenado a -20 °C. O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria em absorbância a 260 nm e 280 nm. A relação entre as absorbâncias 260/280 nm foi utilizada para estimar a contaminação por proteínas. Foram considerados de boa qualidade os RNAs cuja relação 260/280 nm estiverem entre 1,8 e 2,0. Logo após, o DNA complementar foi sintetizado através da transcriptase reversa M-MLV, que promove uma fita de DNA complementar a partir de RNA de fita simples. A parte final inclui a PCR em tempo real, por meio do sistema do corante SYBR Green, que possui ligação altamente específica ao DNA dupla-fita, para detectar o produto da PCR conforme ele se acumula durante os ciclos da reação (Bustin, 2002).

3.13 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

3.14 OXIDANTES

3.14.1 DCFH-DA

Os níveis de 2,7-diclorofluoresceína oxidada (DCF) foram monitorados em amostras incubadas com 10 mM diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) a 37 °C por 30 minutos, com n = 70. A formação de derivados fluorescentes oxidados foi monitorada em comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 525nm, respectivamente, usando um espectrofotômetro de fluorescência. Uma curva padrão DCF foi medida usando 10 mM DCF como um controle interno no experimento, e os resultados foram expressos como intensidade de fluorescência (Wang; Joseph, 1999).

3.14.2 Indicador da formação de óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi avaliada espectrofotometricamente através do metabólito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente Griess (1 % sulfanilamida em 0,1 mol/L HCl e 0,1 % de dicloridrato de n-(1-naftil) -etilenodiamina) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância foi medida a 540 nm usando leitor de microplacas, com n = 70. O conteúdo de nitritos foi calculado com base em uma curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabólito nitrito de sódio. Os resultados foram calculados em μmol nitrito/mg proteína (Chae et al., 2004).

3.15 MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS

3.15.1 Grupos sulfidril

O teor de tiol total foi determinado usando o método com DTNB (reagente de Ellman). Resumidamente, 30 mL de amostra foram misturados com 1 mL de solução salina tamponada com fosfato/1 mM de EDTA (pH 7,5), com n = 70. A reação foi inicializada pela adição de 30 μL de solução estoque de DTNB 10 mM em solução salina tamponada com fosfato. Amostras de controle, que não incluem DTNB ou proteína, foram executadas simultaneamente. Após incubação por 30 minutos em temperatura ambiente, foi realizada leitura da absorbância em 412 nm e calculada a quantidade de TMB (equivalente à quantidade de grupos sulfidril) (Aksenov; Markesbery, 2001).

3.15.2 Carbonilação de proteínas

O dano oxidativo de proteínas foi determinado mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a 2,4-dinitrofenilhidrazina, com n = 70. As proteínas foram precipitadas pela adição de ácido tricloroacético a 20% e reação com 2,4- dinitrofenilhidrazina. As amostras foram então redissolvidas em cloridrato de guanidina 6M e os conteúdos de carbonila foram determinados medindo a absorbância em 370 nm e usando um coeficiente de absorção molar de 22.000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Levine et al., 1990).

3.16 DEFESAS ANTIOXIDANTES

3.16.1 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pela inibição da oxidação da adrenalina. As amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão de glicina, com $n = 70$. Volumes de 5, 10 e 15 μl de amostra foram separados após homogeneização e 5 ml de catalase (0,0024 mg/ml em água destilada), 175-185 ml de tampão glicina (0,75 g em 200 ml de água destilada a 32 °C, pH 10,2), e 5 μl de adrenalina (60 mM em água destilada mais 15 ml/ml de HCl fumegante) foram adicionados, incubados por 180 segundos em intervalos de 10 segundos e medidos em um leitor SpectraMax i3xELISA a 480 nm. Os valores foram expressos como unidade SOD/mg de proteína (U/mg de proteína) (Bannister e Calabrese, 1987).

3.16.2 Glutathione (GSH)

Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin & Hilf, com algumas adaptações, com $n = 70$. GSH foi mensurada nas amostras de tecido após precipitação de proteína com ácido tricloroacético a 10%. Em parte da amostra foi adicionado 800 mM de tampão fosfato (pH 7,4) contendo 500 mM de o-ftaldialdeído. O desenvolvimento de cor resultante a partir da reação entre o-ftaldialdeído e tióis atingiu o máximo em 5 minutos e manteve-se estável durante mais de 30 min. A absorbância foi lida a 412 nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutathione reduzida foi usada para calcular os níveis de GSH nas amostras. Os resultados são expressos como U fluorescência/mg de proteína (Hissin e Hilf, 1976).

3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de memória de habituação ao campo aberto e Y-maze foram analisados por teste T de Student para amostras pareadas. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Os resultados do teste de labirinto octogonal foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via de medidas repetidas, seguido do teste de post hoc Tukey quando apropriado. Além disso, os dados de análises histológicas e bioquímicas foram expressos em média e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela ANOVA de uma via, seguido pelo teste post hoc

Tukey. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de $P < 0,05$. Foi utilizado o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 17.0 como pacote estatístico.

4 RESULTADOS

4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS

A figura 5 mostra os dados do teste do labirinto em Y nos camundongos Black-C57 (C57/BL6). Os animais do grupo ACSF passaram mais tempo no braço “novo” quando comparados ao braço “outro”, indicando que eles foram capazes de localizar e reconhecer espacialmente o novo braço ($p < 0,05$). Os animais dos grupos de modelo de demência semelhante à DA não foram capazes de reconhecer o novo braço e o exploraram tanto quanto os outros braços, demonstrando que não houve aprendizado. Já os grupos $\beta A_{1-42} + DAP1-2$, $\beta A_{1-42} + GNPs$ e $\beta A_{1-42} + GNPs + DAP1-2$ demonstraram reconhecer e explorar mais o novo braço sendo semelhante ao controle ($p < 0,05$), e não apresentando dano na memória espacial de curta duração.

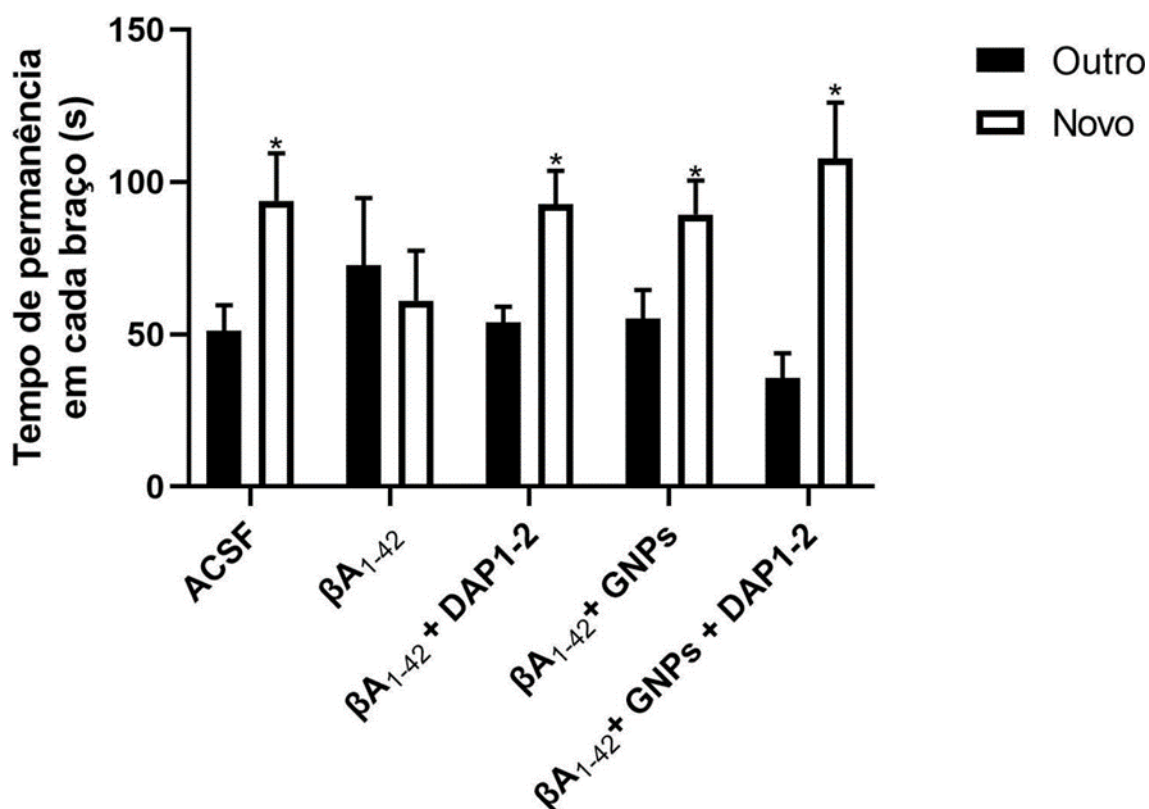


Figura 5: Efeitos do tratamento com DAP1-2 e GNPs sobre os dados do teste comportamental do Labirinto em Y em camundongos Black-C57 (C57/BL6) (n-14 animais/grupo). Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s βA_{1-42} ; ** $p < 0,01$ v.s βA_{1-42} ; *** $p < 0,001$ v.s βA_{1-42} ; \$ $p < 0,0001$ v.s βA_{1-42} ; # $p < 0,05$ v.s Grupo ACSF e quando comparado à sessão treino no mesmo grupo experimental. Seguindo do teste T de Student para amostras pareadas.

A figura 6 mostra os dados referentes ao teste de labirinto radial nos camundongos Black-C57 (C57/BL6). Estes resultados foram analisados durante quatro dias e comparados ao primeiro dia do teste dentro dos mesmos grupos experimentais. Em relação ao parâmetro de tempo total (figura 6), conforme elucidado abaixo, observa-se que o grupo ACSF aprendeu a tarefa no quarto dia de experimento, demonstrando que não houve dano na memória de longo prazo destes animais. No entanto, os grupos βA_{1-42} , $\beta A_{1-42}+DAP1-2$, $\beta A_{1-42}+GNPs$ não demonstraram este mesmo aprendizado, indicando dano na memória espacial destes animais. Apenas o grupo $\beta A_{1-42}+GNPs+DAP1-2$ demonstrou aprendizagem no quarto dia, assim como o grupo ACSF. A figura 7 mostra os dados do teste de campo aberto nos camundongos Black-C57 (C57/BL6). Na figura A todos os grupos experimentais demonstraram diminuição do número de cruzamentos quando comparado o teste com o treino.

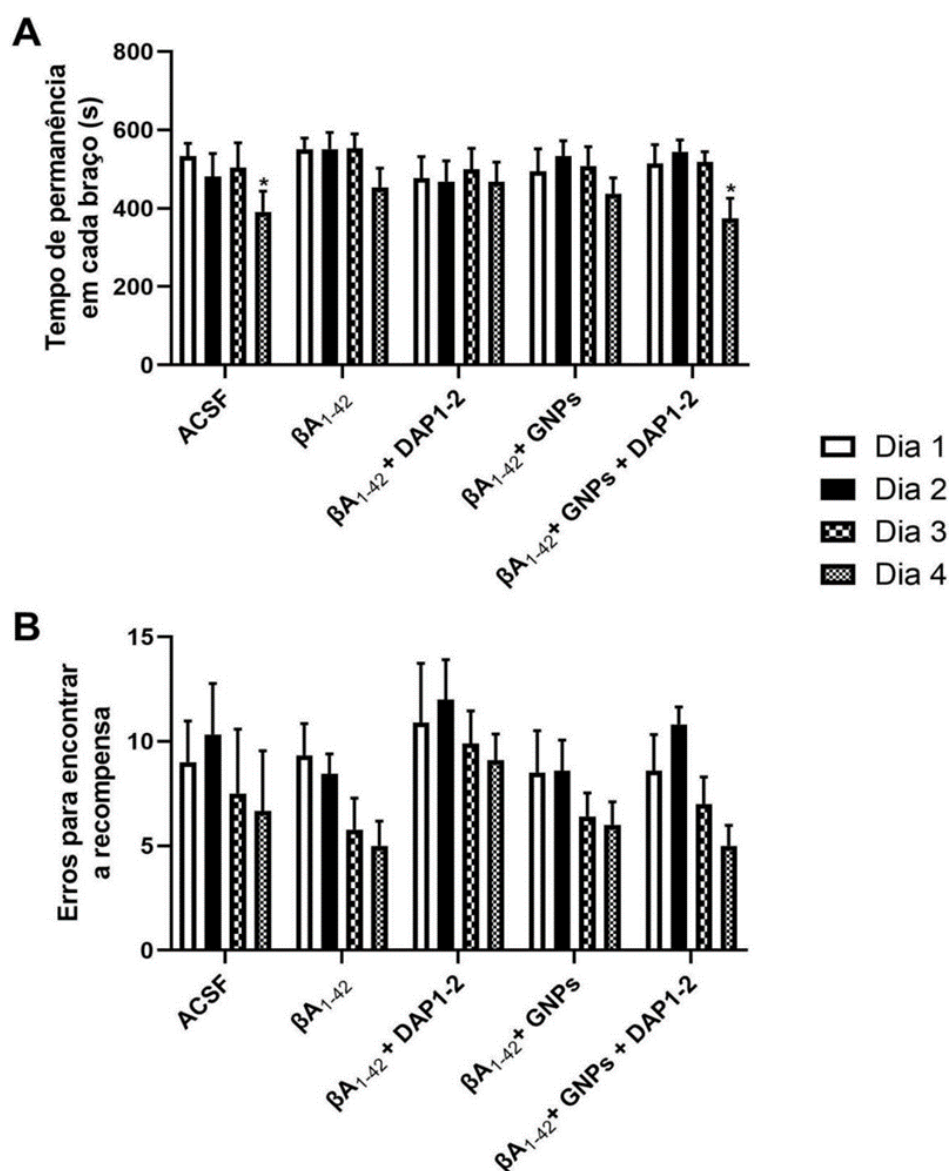


Figura 6: Efeitos do tratamento com DAP1-2 e GNPs sobre os dados do teste comportamental no labirinto radial em camundongos Black-C57 (C57/BL6) (n=12 animais/grupo). Os dados mostram o tempo (A) e o número de

erros (B) para encontrar a recompensa. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s βA 1-42; ** $p < 0,01$ v.s βA 1-42; *** $p < 0,001$ v.s βA 1-42; \$ $p < 0,0001$ v.s βA 1-42; # $p < 0,05$ v.s Grupo ACSF e quando comparado ao primeiro dia de experimento. (ANOVA de uma via de medidas repetidas, seguido do teste de post hoc Tukey).

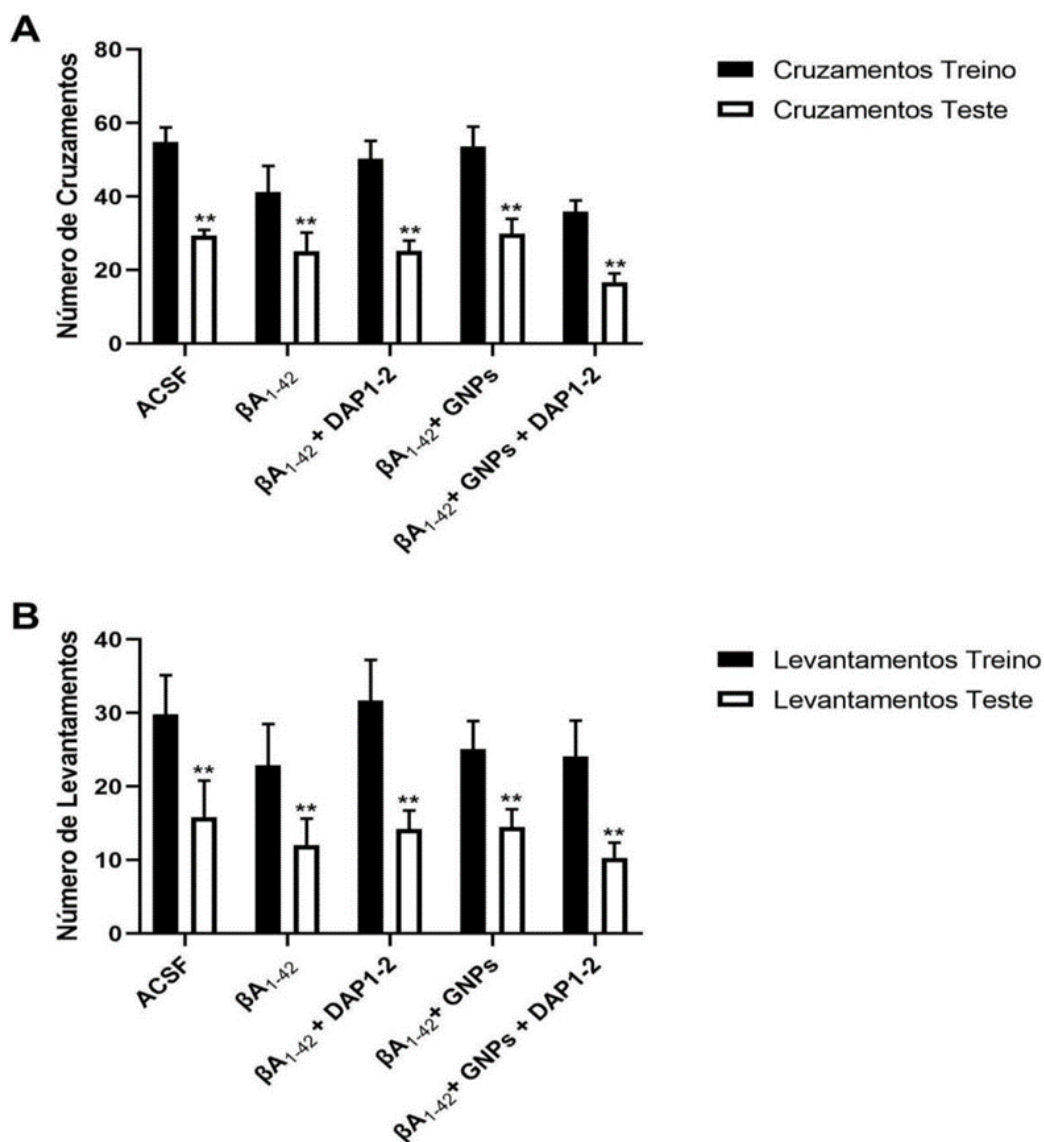


Figura 7: Efeitos do tratamento com DAP1-2 e GNPs sobre os dateste de campo aberto em camundongos Black-C57 (C57/BL6) (n-12 animais/grupo). Os dados mostram o número de cruzamentos (A) e o número de levantamentos (B) dos camundongos em campo aberto. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s βA 1-42; ** $p < 0,01$ v.s βA 1-42; *** $p < 0,001$ v.s βA 1-42; \$ $p < 0,0001$ v.s βA 1-42; # $p < 0,05$ v.s Grupo ACSF e quando comparado ao primeiro dia de experimento. (ANOVA de uma via de medidas repetidas, seguido do teste de post hoc Tukey).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS GNPS

Foi realizada análise de espectrofotômetro UV-Vis, confirmando a formação das GNPs com curcumina. O comprimento de onda máximo em 527 nm confirma a formação de

nanopartículas metálicas. Conforme a mesma metodologia, também descrita por Casagrande, a caracterização das GNPs foram obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. Como pode-se observar as GNPs apresentaram morfologia esférica e um tamanho médio de 25 nm (Casagrande, 2023). A síntese de nanopartículas de ouro conjugadas com curcumina e sua biocompatibilidade foram demonstradas por espectroscopia FTIR e por potencial zeta (Sindhu et al. 2014; Casagrande, 2023).

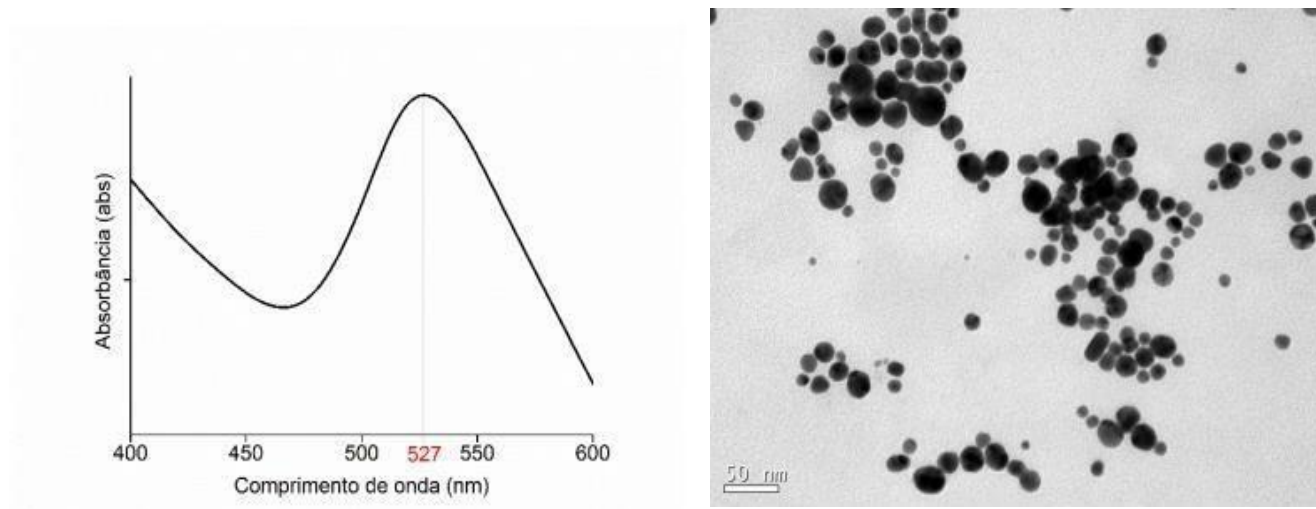


Figura 8: (Esquerda) Análise de absorvância das GNPs sintetizadas com curcumina; em (Direita) a microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas com curcumina. Fonte: Adaptado de Casagrande, 2023.

4.3 HISTOLOGIA

Na figura 9 é demonstrado as quantificações da média de número de infiltrado inflamatório no fígado. Não foi possível observar diferenças significativas no número de infiltrados inflamatórios entre os grupos experimentais analisados ($p > 0.05$).

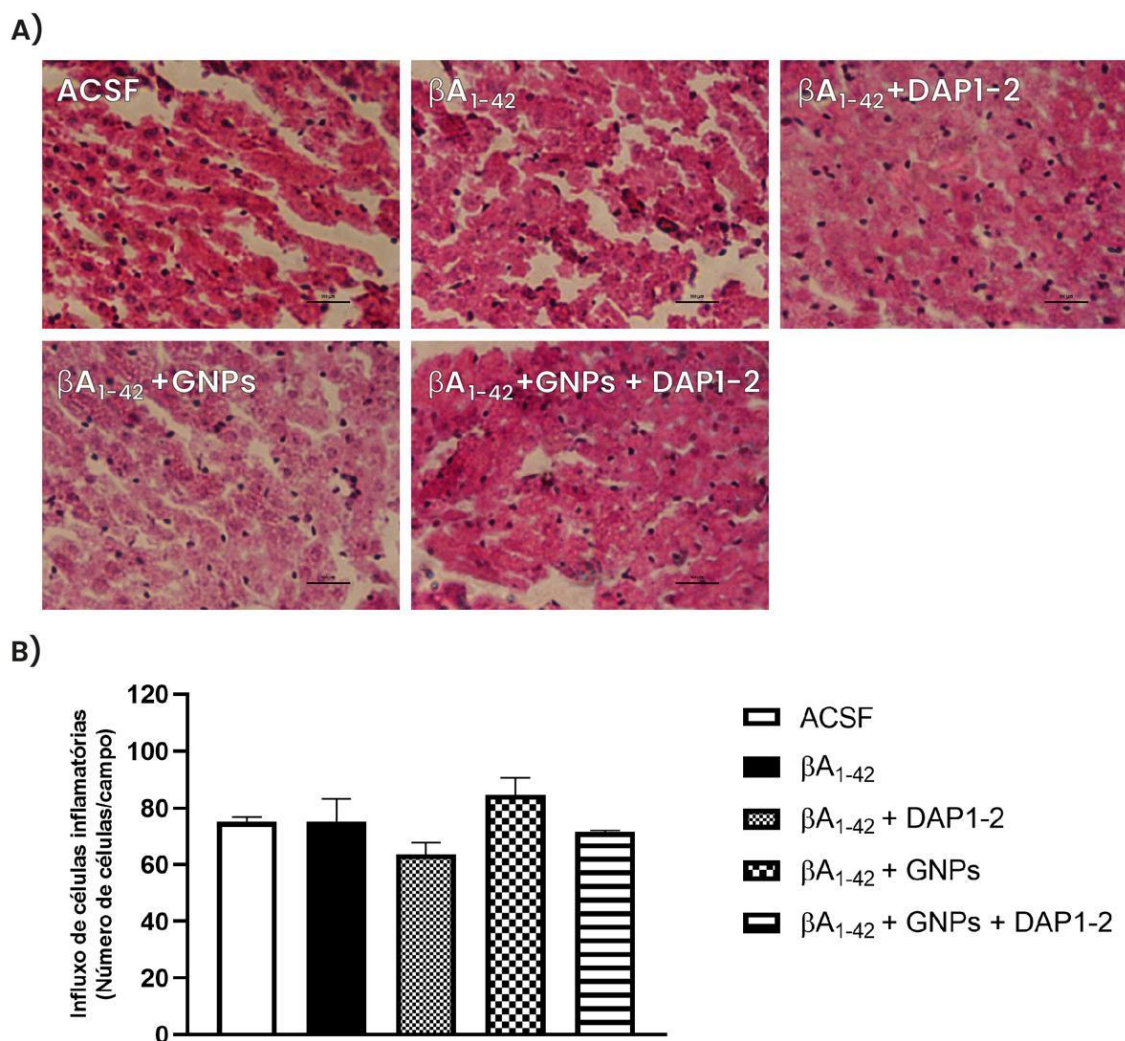


Figura 9: Efeitos do tratamento com DAP1-2 e/ou GNPs sobre a análise histológica com coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) no fígado (n-14 animais/grupo). Em A infiltrado inflamatório; em B número médio de infiltrado inflamatório. Os dados são expressos como média \pm SEM.

4.4 MARCADOR DE ERN E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os níveis de nitrito, DCF, carbonil, sulfidrilas, SOD e GSH foram avaliados no fígado, demonstrados na figura 10, não apresentaram alterações significativas nos seus níveis em qualquer grupo.

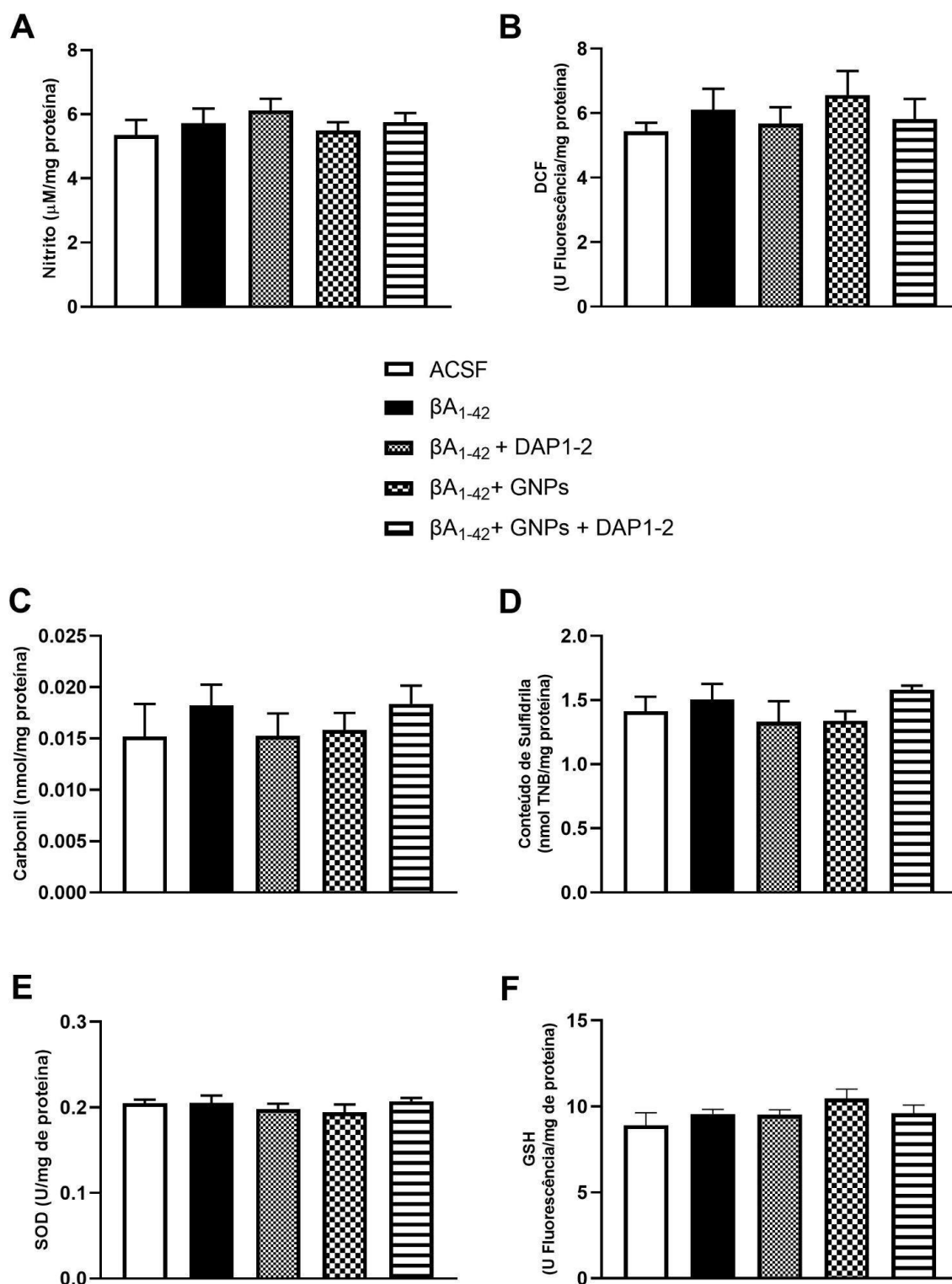


Figura 10: Efeitos do tratamento com DAP1-2 e GNPs sobre parâmetros oxidativos no fígado avaliados 19 dias após indução de βA 1-42 (n=7 animais/grupo). Nos gráficos são apresentadas as avaliações de nitrito em A, DCF em B, carbonil em C, sulfidril em D, SOD em E e GSH em F. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s βA 1-42; ** $p < 0,01$ v.s βA 1-42; *** $p < 0,001$ v.s βA 1-42; \$ $p < 0,0001$ v.s βA 1-42; # $p < 0,05$ v.s Grupo ACSF (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.5 FATORES NEUROTRÓFICOS

Na figura 11 é possível observar os níveis de BDNF e NGF- β no córtex pré-frontal. Os grupos βA_{1-42} +DAP1-2, βA_{1-42} +GNPs não demonstraram alterações significativas nos níveis de BDNF quando comparados ao grupo βA_{1-42} . Somente o grupo βA_{1-42} +GNPs+DAP1-2 ($p<0,05$) obteve um aumento nos níveis de BDNF quando comparado ao grupo βA_{1-42} . O grupo βA_{1-42} ($p<0,05$) demonstrou uma redução significativa nos níveis de NGF- β em relação ao grupo ACSF. Os grupos βA_{1-42} +DAP1-2 ($p<0,01$) e βA_{1-42} +GNPs+DAP1-2 ($p<0,001$) obtiveram aumento significativos nos níveis de NGF- β em relação ao grupo βA_{1-42} , e somente o grupo βA_{1-42} +GNPs não demonstrou alteração significativa nos níveis de NGF- β em relação ao grupo βA_{1-42} .

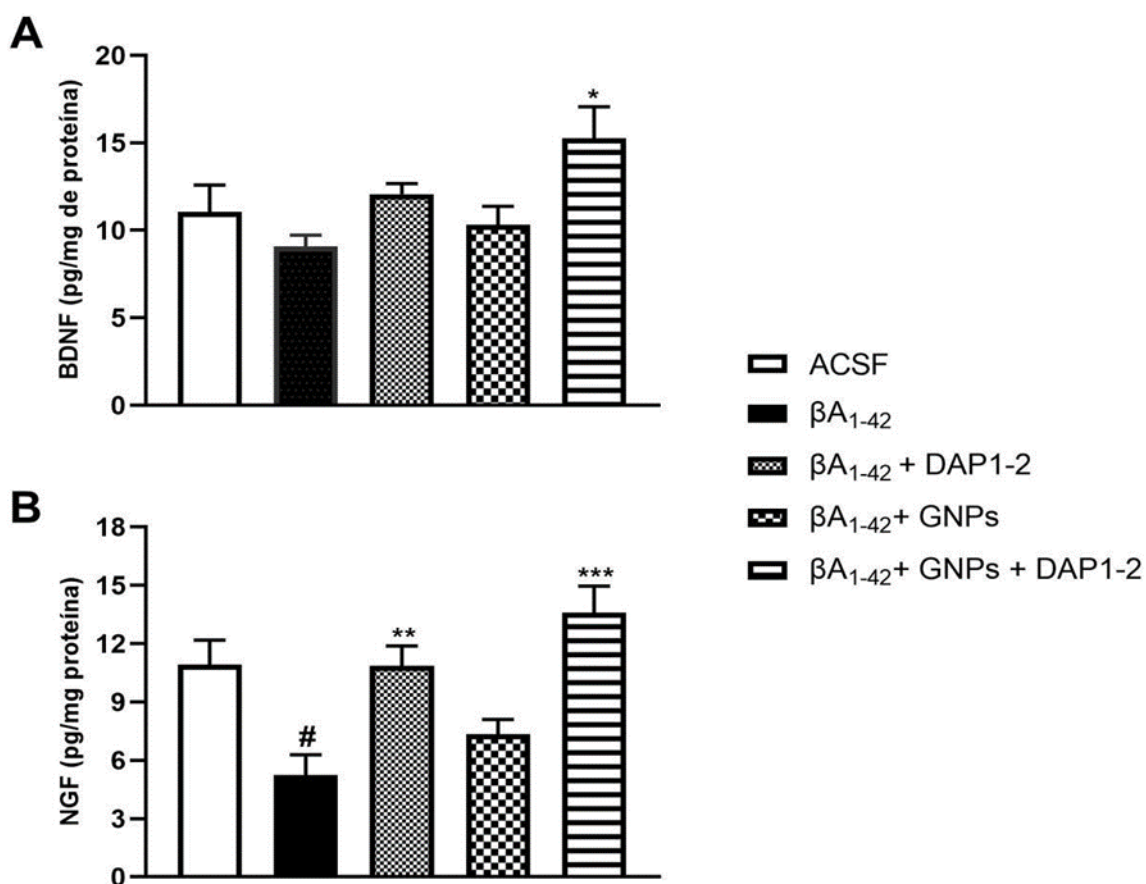


Figura 11: Efeitos do tratamento com DAP1-2 e GNPs sobre níveis de fatores neurotróficos no córtex avaliados 19 dias após indução de βA_{1-42} , (n=7 animais/grupo). Nos gráficos são apresentadas as avaliações de BDNF em A, NGF em B. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p<0,05$ v.s βA_{1-42} ; ** $p<0,01$ v.s βA_{1-42} ; *** $p<0,001$ v.s βA_{1-42} ; \$ $p<0,0001$ v.s βA_{1-42} ; # $p<0,05$ v.s Grupo ACSF (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

No hipocampo (figura 12), houve uma diminuição dos níveis de BDNF no grupo βA_{1-42} quando comparados ao grupo ACSF, observou-se também que todos os grupos tratados, βA_{1-42}

βA_{1-42} +DAP1-2 ($p<0,05$), βA_{1-42} +GNPs ($p<0,05$) e βA_{1-42} +GNPs+DAP1-2 ($p<0,001$), apresentaram um aumento significativo comparado ao grupo βA_{1-42} . Os níveis de NGF- β aumentaram significativamente no hipocampo no grupo βA_{1-42} +GNPs+DAP1-2 ($p<0,05$) em comparação com grupo βA_{1-42} (figura 12B), e os demais grupos tratados não demonstraram alterações significativas nos níveis de NGF- β em relação ao grupo βA_{1-42} .

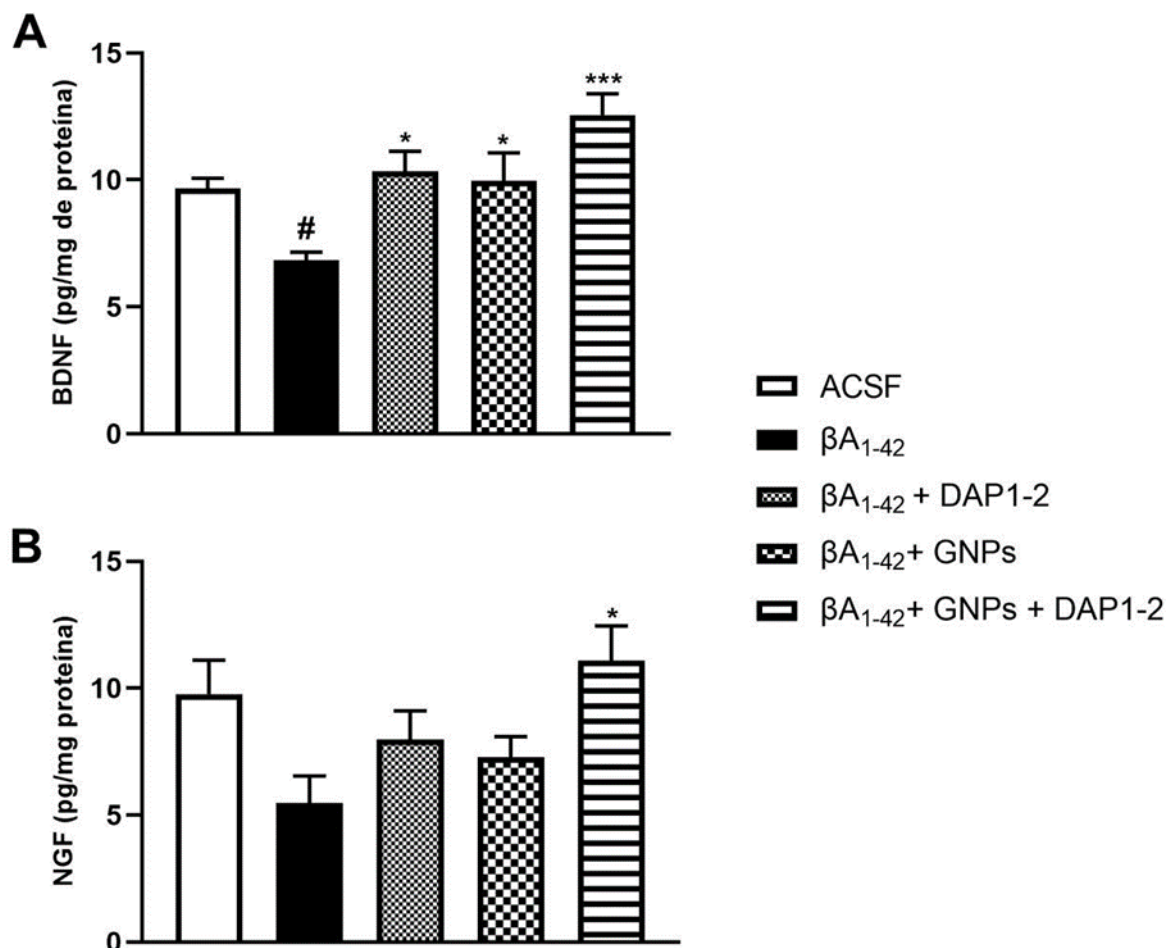


Figura 12: Efeitos do tratamento com DAP1-2 e GNPs sobre níveis de fatores neurotróficos no hipocampo avaliados 19 dias após indução de βA_{1-42} , (n-7 animais/grupo). Nos gráficos são apresentadas as avaliações de BDNF em A, NGF em B. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p<0,05$ v.s βA_{1-42} ; ** $p<0,01$ v.s βA_{1-42} ; *** $p<0,001$ v.s βA_{1-42} ; \$ $p<0,0001$ v.s βA_{1-42} ; # $p<0,05$ v.s Grupo ACSF (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.6 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS

Na figura 13 e figura 14, são apresentados os níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. No córtex pré-frontal, na figura 13 A, houve aumento significativo nos níveis de TNF- α do grupo βA_{1-42} em relação ao grupo ACSF e redução significativa nos níveis de TNF- α nos grupos βA_{1-42} +DAP1-2 ($p<0,001$), βA_{1-42} +GNPs ($p<0,001$), βA_{1-42} +GNPs+DAP1-2 ($p<0,0001$) em relação ao grupo βA_{1-42} . Com relação aos níveis de IL-1 β na figura 13 B, o grupo βA_{1-42} apresentou aumento significativo quando

comparado ao grupo ACSF, e todos os grupos tratados foram capazes de reduzir significativamente os níveis de IL-1 β com relação ao grupo βA_{1-42} . Na análise dos níveis da citocina IL-10 na figura 13 C, houve um aumento significativo nos grupos βA_{1-42} +DAP1-2 e βA_{1-42} +GNPs+DAP1-2 quando comparados ao grupo βA_{1-42} . Na figura D, não demonstrou-se alterações significativas nos níveis da citocina TGF- β em qualquer grupo.

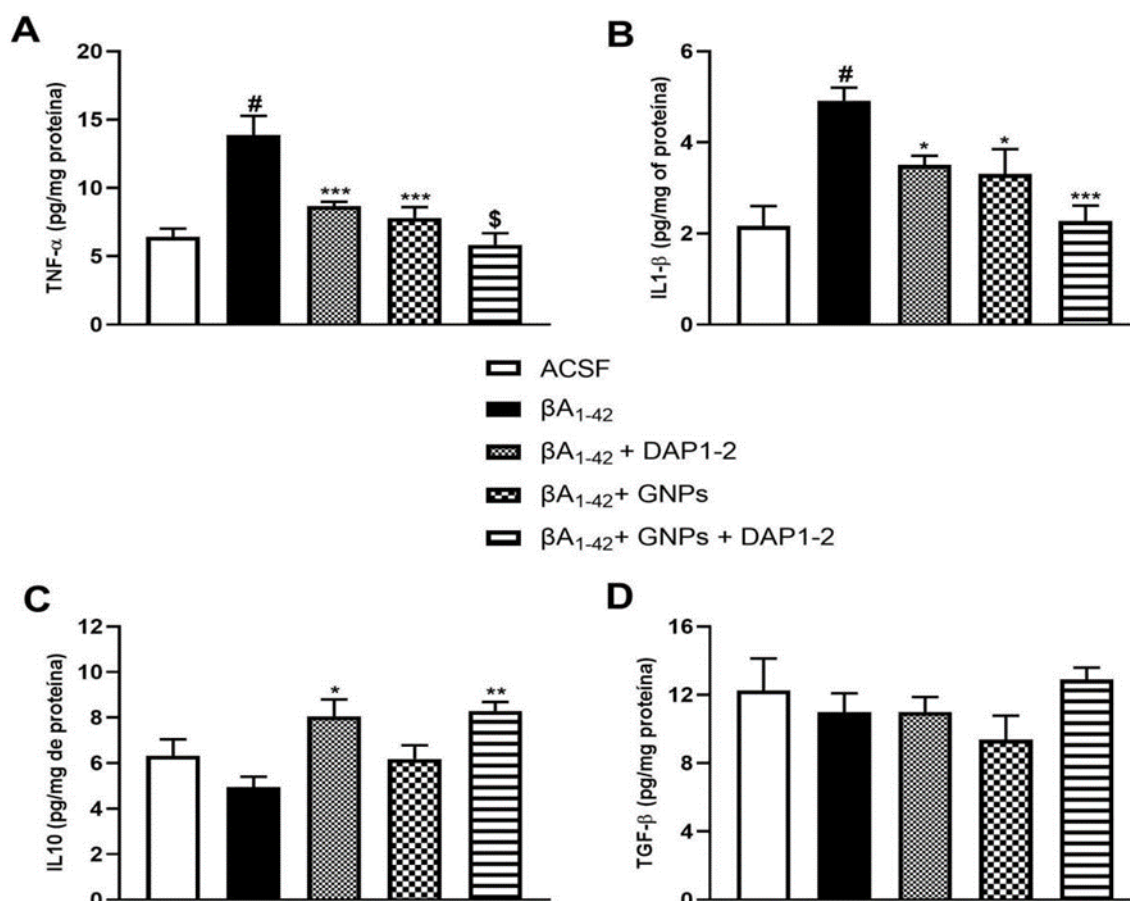


Figura 13: Efeitos do tratamento com DAP1-2 e GNPs sobre parâmetros de expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias do córtex avaliados 19 dias após indução de βA_{1-42} (n=7 animais/grupo). Nos gráficos são apresentadas as avaliações de TNF- α em A, IL-1 β em B, IL-10 em C e TGF- β em D. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s βA_{1-42} ; ** $p < 0,01$ v.s βA_{1-42} ; *** $p < 0,001$ v.s βA_{1-42} ; \$ $p < 0,0001$ v.s βA_{1-42} ; # $p < 0,05$ v.s Grupo ACSF (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

Já na análise de hipocampo (figura 14), observou-se que os níveis de TNF α tiveram um aumento nos grupos βA_{1-42} , βA_{1-42} +DAP1-2 e βA_{1-42} +GNPs comparados com o grupo ACSF, e uma redução significativa do grupo βA_{1-42} +GNPs+DAP1-2 ($p < 0,0001$) em relação ao grupo βA_{1-42} , figura 14 A. Os níveis de IL-1 β , figura 14 B, apresentaram aumento significativo no grupo βA_{1-42} quando comparados ao grupo ACSF, e apenas o grupo βA_{1-42} +GNPs+DAP1-2 foi capaz de reduzir os níveis de IL-1 β quando comparados ao grupo βA_{1-42} . Os níveis de IL-10 e

TGF- β , representados pela figura 14 C e D, não apresentaram diferenças significativas em qualquer grupo.

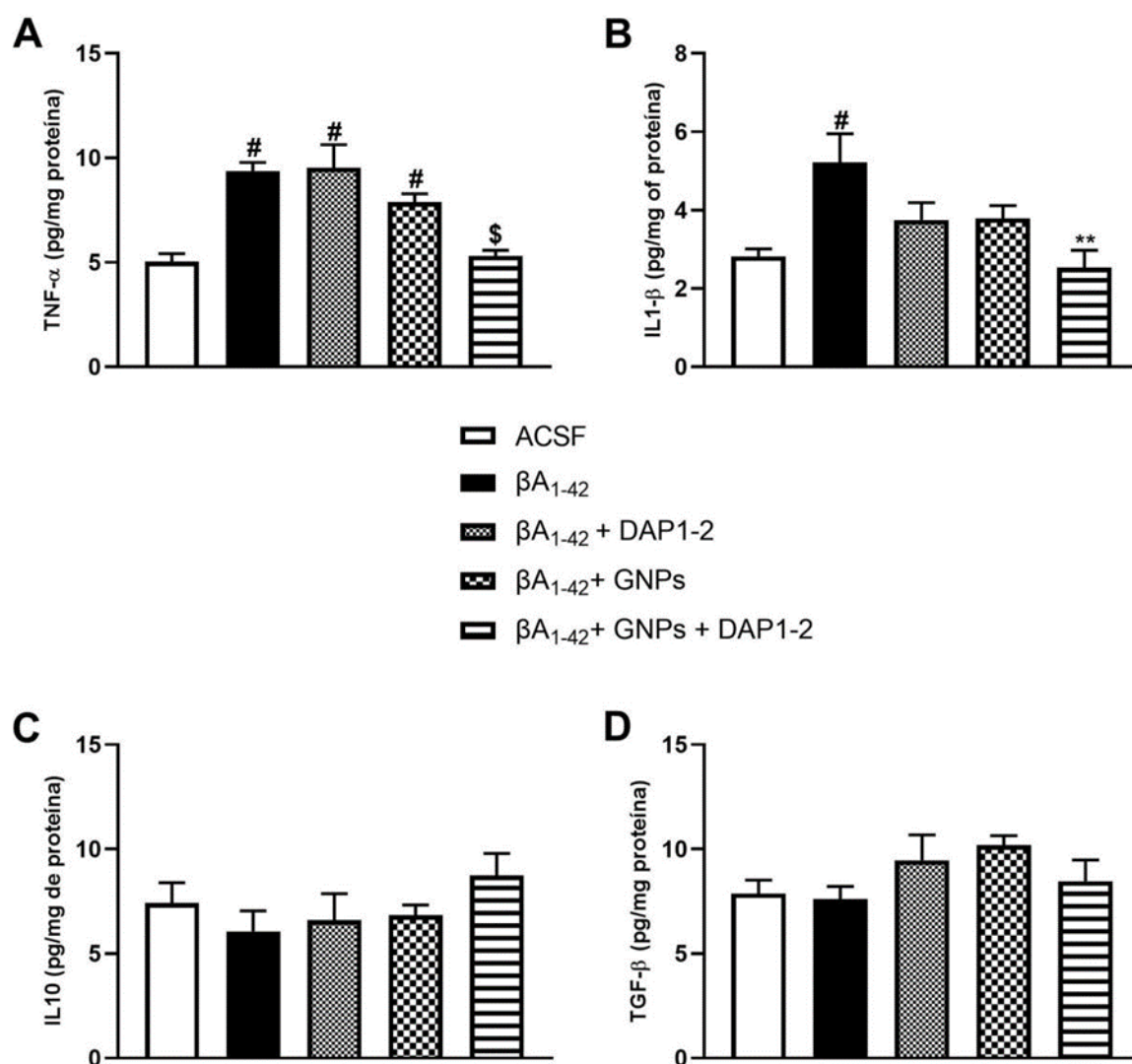


Figura 14: Efeitos do tratamento com DAP1-2 e GNPs sobre parâmetros de expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias do hipocampo avaliados 19 dias após indução de βA_{1-42} (n=7 animais/grupo). Nos gráficos são apresentados as avaliações de TNF- α em A, IL-1 β em B, IL-10 em C e TGF- β em D. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: *p<0,05 v.s βA_{1-42} ; **p<0,01 v.s βA_{1-42} ; ***p<0,001 v.s βA_{1-42} ; \$p<0,0001 v.s βA_{1-42} ; #p<0,05 v.s Grupo ACSF (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.7 RT-PCR

Na figura 15 são mostrados os parâmetros de expressão gênica dos marcadores IL-1 β , NF κ B, IBA-1 e APP no hipocampo de camundongos Black-C57 (C57/BL6). Em A, o grupo βA_{1-42} apresentou um aumento significativo da expressão de IL-1 β comparado ao grupo ACSF, e não apresentando diferenças significativas em qualquer grupo tratado. Em B e C, não

houveram alterações significativas da expressão de NFκB ou IBA-1 em qualquer grupo. Em D, o grupo βA 1-42 apresentou um aumento significativo da expressão de APP e redução significativa da expressão de APP em todos os grupos tratados.

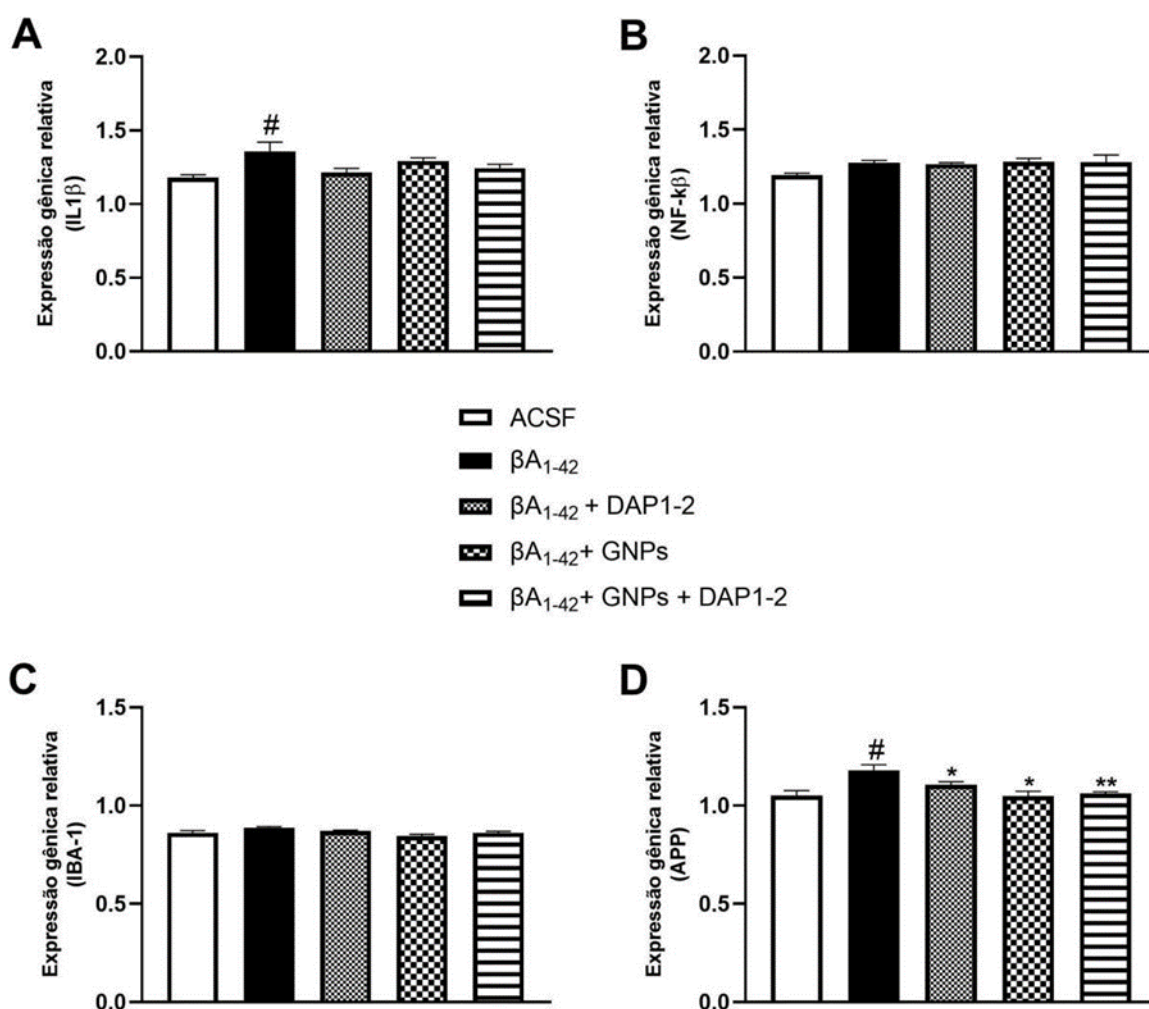


Figura 15: Efeitos do tratamento com DAP1-2 e GNPs sobre parâmetros de expressão gênica dos marcadores IL-1β, NFκB, IBA-1 e APP no hipocampo avaliados 19 dias após indução de βA 1-42 (n=7 animais/grupo). Nos gráficos são apresentadas as avaliações de IL-1β em A, NFκB em B, IBA-1 em C e APP em D. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: *p<0,05 v.s βA 1-42; **p<0,01 v.s βA 1-42; ***p<0,001 v.s βA 1-42; \$p<0,0001 v.s βA 1-42; #p<0,05 v.s Grupo ACSF (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

5. DISCUSSÃO

A DA é a forma mais comum de demência, apresentando desafios globais significativos e crescentes, com etiologia complexa e multifatorial, não totalmente elucidada, incluindo o envelhecimento, fatores genéticos e ambientais, com os atuais medicamentos apresentando impactos terapêuticos limitados (Scheltens et al., 2021). Neste contexto, o presente estudo apresentou, no modelo animal de DA, resultados promissores, principalmente quando as GNPs foram associadas ao DAPI-2, com melhora dos parâmetros comportamentais, nas memórias de curto e longo prazos, e neuroinflamatórios, notadamente por redução dos níveis cerebrais de IL-1 β e TNF- α , e redução da expressão gênica de APP, e incremento de fatores neurotróficos BDNF e NGF.

O número global de pessoas com demência do tipo Alzheimer, DA prodromal e DA pré-clínica foi estimado em 32, 69 e 315 milhões, respectivamente. Juntas, essas condições constituem um total de 416 milhões ao longo do *continuum* da DA, representando 22% de todas as pessoas com 50 anos ou mais. Ao considerar os estágios pré-demenciais, o número de pessoas com DA é provavelmente significativamente maior do que o mencionado na literatura disponível. As estimativas são imprecisas, especialmente para os estágios pré-demenciais em regiões de baixa e média renda, onde faltam estudos avançados de imagem ou de biomarcadores (Gustavsson et al., 2023).

A compreensão atual da fisiopatologia da DA abrange diversas hipóteses, como as colinérgicas, formação de placas amiloides, fosforilação de proteína tau, estresse inflamatório e oxidativo, excitotoxicidade do glutamato, genéticas, anomalias nas células da glia, micróglia e astrócitos, em neurônios, vasculopatia amiloide, diabetes e resistência a insulina, dentre outros. Contudo, compreender a interação entre diversos aspectos fisiopatológicos e identificação de alterações precoces na DA requer maiores estudos (Knopman et al., 2021).

As estratégias atuais para o manejo da DA focam em três aspectos fundamentais: prevenção, diagnóstico precoce e tratamento medicamentoso ou não medicamentoso. O controle de fatores de risco que podem ser alterados representa um caminho para a prevenção da DA, podendo auxiliar na diminuição do declínio cognitivo e na redução do risco de desenvolvimento da doença (Madnani, 2023).

Os medicamentos disponíveis são divididos em dois grandes grupos: os que trazem alívio sintomático e que muitas vezes são acompanhados por efeitos colaterais indesejáveis, sem modificar a evolução natural da doença; e os atuais modificadores da evolução da doença.

Ressaltando que a DA continua sendo uma doença sem cura, neurodegenerativa progressiva e com alta morbidade e mortalidade (Zhang et al., 2024).

Os medicamentos que reduzem os sintomas da doença em seus estágios iniciais incluem os inibidores da acetilcolinesterase e antagonistas dos receptores NMDA. No entanto, à medida que a patologia avança, novas abordagens terapêuticas se tornam necessárias, uma vez que a eficácia desses fármacos em aliviar os sintomas tende a diminuir ao longo do tempo (Selkoe et al., 2024).

Diante de resultados clínicos discretos e questionáveis das atuais medicações modificadoras da evolução natural da doença, representadas unicamente pela classe dos anticorpos monoclonais anti- β A, com custos proibitivos e possíveis eventos adversos graves, explorar outras vias terapêuticas, incluindo medicamentos para reduzir a neuroinflamação e o estresse oxidativo, melhorar o fluxo sanguíneo cerebral e aumentar fatores neuroprotetores é promissor e necessário na busca de medidas terapêuticas eficientes na DA (Self et al., 2023).

Desta forma, o presente estudo propõe-se uma nova abordagem de tratamento em modelo animal de DA, através da administração intranasal do inovador peptídeo antagonista dos domínios 1 e 2 do receptor de IL-1 β , DAP1-2, desenvolvido e sintetizado em colaboração com o grupo de pesquisa em Biotecnologia Aplicada do Laboratório de Fisiopatologia Experimental – UNESC, e da estabelecida nanotecnologia de GNPs produzidas por síntese verde com extrato *Curcuma longa*, para fins terapêuticos, em um modelo animal. Estes sendo compostos comprovadamente eficientes na redução do processo inflamatório e estresse oxidativo, uma das bases fisiopatológicas bem estabelecidas da DA (dos Santos Tramontin et al., 2020; De-Pieri et al., 2024). Destacando, também, a via de administração intranasal, que representa vi de administração eficaz e com pouco desconforto a futuros pacientes portadores de DA (Lochhead et al, 2012; Nance et al., 2022).

As principais hipóteses que explicam a fisiopatologia da DA incluem a deposição β A, principalmente composta de peptídeos β A₁₋₄₂, hiperfosforilação da proteína Tau com formação de emaranhados neurofibrilares (NFTs), desregulação da homeostase de Ca²⁺, disfunção do eixo colinérgico e estresse oxidativo relacionado à deposição de A β e NFTs. A DA é considerada uma proteinopatia mista, caracterizada pela deposição de proteínas amiloide e tau, com disfunção e morte neuronal progressiva, comprometendo precocemente o hipocampo e córtex prefrontal, e evoluindo tardiamente para todo o cérebro (García-Morales et al., 2021).

O modelo de demência em camundongos foi estabelecido por meio da injeção intracerebroventricular do peptídeo β A₁₋₄₂. A escolha dessa técnica, assim como a dosagem

utilizada, baseou-se em pesquisas anteriores, nas quais a injeção ICV do peptídeo causou comprometimento da memória espacial e declínio na capacidade de aprendizagem (Budni et al., 2017; Garcez et al., 2019). As tarefas de memória associativa incluem a memória espacial, um tipo de memória que depende do funcionamento adequado do hipocampo. Essa região cerebral é fundamental para a orientação espacial e a navegação, sendo uma das áreas mais afetadas pela DA (Lee et al., 2014).

Uma das grandes preocupações em medicamentos para DA é a toxicidade sistêmica e efeitos adversos (Lazarević-Pašti, 2023). As GNPs são consideradas seguras para uso em modelos de neuropatias, assim como em diversas outras patologias, respeitando dosagem, morfologia, tamanho e modelo de síntese destas, e por se tratar de composto com propriedades colóides, a hepatotoxicidade é uma das principais preocupações, apesar da robustez dos estudos demonstrando biossegurança (Sani et al., 2021).

Diante do exposto, os resultados do presente estudo não demonstraram infiltrado inflamatório significativo no fígado dos camundongos em nenhuma das terapias com GNPs avaliadas por análise histológica, ressaltando que o método de produção das GNPs do experimento foi por síntese verde reduzidas com curcumina, obtendo efeitos sinérgicos e com menor toxicidade (Mendes et al., 2024). Assim como, não houve aumento do estresse oxidativo por marcadores de EROs e ERNs, demonstrando a segurança das GNPs, o que é concordante com estudos anteriores (Muller et al., 2017; dos Santos Tramontin et al., 2020; de Bem Silveira et al., 2021).

Os grupos tratados com DAP1-2, associados ou não a GNPs, também não apresentaram alterações inflamatórias significativas por análise histológica ou aumento dos marcadores de estresse oxidativos no fígado, o que indica segurança toxicológica e representa achado inédito, já que este peptídeo antagonista do receptor IL1- β DAP1-2 foi sintetizado e descrito pela primeira vez recentemente (De-Pieri, 2022; De-Pieri et al., 2024). Sendo este estudo, um dos primeiros a utilizar o DAP1-2 em modelo animal, ambos com resultados promissores (Zaccaron, 2021; Beirão, 2022).

Os testes comportamentais demonstraram danos na memória espacial de curto prazo no grupo βA_{1-42} ao avaliar os camundongos no teste de labirinto em Y, o que já havia sido estabelecido por outros estudos (Budni et al., 2017; Garcez et al., 2018). Sendo que os grupos tratados com GNPs e DAP1-2, isolados ou combinados, reverteram o comprometimento da memória espacial de curto prazo no teste de labirinto em Y, demonstrando a melhora do aprendizado. O efeito favorável das GNPs na memória espacial de curto prazo também foi demonstrado em outro estudo, consolidando o papel terapêutico desta em modelos da DA

(Casagrande, 2023).

Na avaliação da memória espacial de longo prazo dos camundongos pelo teste de labirinto radial, foi demonstrado danos no grupo βA_{1-42} , com reversão destes apenas no grupo tratado com GNPs e DAP1-2, indicando que o bloqueio da via inflamatória da IL1- β pode representar uma alternativa terapêutica complementar inovadora para o tratamento da DA, corroborado por estudos recentes (Li et al., 2024).

Ao avaliar os dados do teste de habituação ao campo aberto, não foi observada a perda de memória de habituação, nem mesmo no grupo submetido ao modelo de demência. Esse resultado pode ser relacionado à exposição ao isoflurano, que possivelmente influenciou a deposição do peptídeo βA_{1-42} em algumas áreas cerebrais correlacionadas com a memória de habituação, destacando a hipótese de um efeito neuroprotetor seletivo no modelo utilizado (Vianna et al., 2000; Casagrande, 2023).

Ao contrário dos achados anteriores, que apontaram danos à memória de curto e longo prazo com a utilização do mesmo anestésico, acredita-se que a ação do medicamento tenha sido distinta nas áreas cerebrais associadas aos diversos tipos de memória (Quiroga et al., 2014; Casagrande, 2023).

A DA é acompanhada pela desregulação de fatores neurotróficos e seus receptores, que desempenham um papel crítico na degeneração cerebral. O incremento dos níveis de neurotrofinas desempenham um potencial terapêutico para doenças neurodegenerativas, estas são capazes de prevenir a morte celular em condições degenerativas e podem melhorar o desenvolvimento e a função neuronal na DA (Nasrolahi et al., 2022).

Entre as neurotrofinas, destacam-se nas doenças neurodegenerativas o BDNF e o NGF, além de outras como a neurotrofina-3 e a neurotrofina-4/5, que têm origem em um gene ancestral comum e apresentam sequências e estruturas semelhantes, sendo que vários processos nos neurônios, como sobrevivência, migração, crescimento axonal, formação de sinapses e plasticidade neuronal, são regulados positivamente por neurotrofinas (Azman et al., 2022).

No hipocampo a redução dos níveis de BDNF prejudicam a memória dependente desta estrutura, com um dos mecanismos a destruição de sinapses neuronais. Foi comprovado que o BDNF é capaz de salvaguardar e/ou reparar neurônios e sinapses do hipocampo, mesmo em situações de acúmulo de βA e toxicidade neuronal, através do estímulo à ativação de TrkB. Isso indica que a via de sinalização BDNF/TrkB pode ter um papel relevante na patogênese da DA, indicando sua capacidade terapêutica em ambiente neuroinflamatório (Banerjee et al., 2023).

O BDNF está presente em todas as áreas do SNC, abrangendo as áreas cortical,

hipocampal, nigral, amígdala e talâmica. O hipocampo possui o nível mais elevado de mRNA do BDNF. O incremento do BDNF demonstrou aumentar a potenciação de longa duração (LTP) hipocampal e inibiu o efeito de β A e tau na perda celular. Além disso, o tratamento com BDNF diminui toxicidade de β A ao promover o processamento de APP pela α -secretase em detrimento da via amiloidogênica pela β -secretase, reduzindo a formação de placas A β (Gao et al., 2022).

A redução significativa dos níveis de BDNF no hipocampo do grupo β A₁₋₄₂ são concordantes com relatos de comprometimento precoce e significativo deste por β A, um dos mecanismos centrais na patogênese do comprometimento da memória na DA, demonstrado também no experimento (Gao et al., 2022).

Níveis elevados de IL-1 β inibem a LTP, especialmente no hipocampo, modulando a condutância de Ca²⁺ por meio dos receptores N-metil-D-aspartato, que são receptores de glutamato ionotrópicos que formam canais iônicos controlados, sendo críticos para a função sináptica em todo o SNC. A IL-1 β suprime LTP diretamente nos neurônios, inibindo a transdução dependente de mTOR. Isso pode resultar em um aumento ou inibição do influxo de Ca²⁺ em concentrações baixas ou altas, respectivamente, podendo inibir a cascata de sinalização do BDNF. Sendo a IL-1 β o principal gatilho imunológico da LTP em condições fisiológicas, participa também tanto da modulação da transmissão sináptica GABAérgica basal, supostamente antecedendo e contribuindo para a perda de interneurônios GABAérgicos, quanto da potencialização da plasticidade sináptica como um mecanismo adaptativo/reparador (Rizzo et al., 2018).

Os achados no experimento de aumento dos níveis de BDNF pelo bloqueio da via da IL-1 β pelo DAPI-2 ou pelo efeito anti-inflamatório e antioxidante das GNPs, indicam potencial terapêutico promissor destes compostos, principalmente em conjunto, por apresentarem efeito sinérgico significativo, este último tanto no hipocampo quanto no córtex cerebral (Park et al., 2022).

Os processos moleculares que promovem os efeitos neuroprotetores das GNPs são diversos e envolvem interações complexas em níveis celular e molecular, sendo um dos principais o aumento dos níveis de BDNF e NGF (Chiang et al., 2024). Embora a pesquisa nesse campo tenha avançado, vários mecanismos potenciais foram propostos com base em estudos pré-clínicos. Sugeriu-se que as GNPs possuem características antioxidantes intrínsecas, o que poderia potencializar seus efeitos neuroprotetores (Abdelkader et al., 2022). As GNPs removem ERO e diminuem o estresse oxidativo, um elemento crucial na origem de doenças neurodegenerativas, modificam vias apoptóticas, interferem na ativação da microglia e dos

astrócitos, reduzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1 β , sendo fundamental modular a neuroinflamação para a neuroproteção (Chiang et al., 2020).

As nanopartículas de ouro podem melhorar a diferenciação, maturação e a morfogênese das células nervosas, com efeitos sinérgicos do BDNF e das GNPs na diferenciação de células-tronco mesenquimais em células nervosas especializadas, a exemplo de oligodendrócitos com formação de mielina e prolongamento axonal, melhorando a neurogênese, interação sináptica, memória e o processo de aprendizagem. Foi também demonstrado que o uso de nanopartículas de quitosana carregadas com GNPs e BDNF demonstrou uma grande interação entre ambos compostos, com um aumento de até 90% na eficiência (Seyedebrahimi et al., 2021).

A curcumina, agente redutor na síntese verde das GNPS, possuem também efeitos anti-inflamatório bem estabelecidos, com inibição da síntese de uma série de fatores inflamatórios, como supressão de NOS e forte inibição da expressão gênica de TNF- α , MCP-1, IL-1 β e IL-6. Assim como, é sugerido que os efeitos benéficos da curcumina estão relacionados com o bloqueio da ação das EROs e inibição da ativação NF κ B (Cho et al., 2007).

O NGF é principalmente produzido pelos neurônios GABAérgicos no córtex cerebral de ratos adultos, entre outras regiões do cérebro. O NGF desempenha um papel crucial na regulação da diferenciação, crescimento, sobrevivência e plasticidade de determinados tipos de células, incluindo os neurônios colinérgicos, tanto no SNC quanto no periférico. Os neurônios colinérgicos apresentam receptores para o NGF, incluindo o receptor de tropomiosina quinase A (TrkA, de alta afinidade) e o p75 (também conhecido como receptor de baixa afinidade do NGF, LNGFR, ou receptor de neurotrofina p75, p75NTR). O NGF maduro é, por fim, degradado pela metaloproteinase 9 da matriz (MMP9), cuja expressão é regulada positivamente na DA, induzindo a apoptose neuronal (Mittra et al., 2019).

Apenas nos grupos tratados com DAP1-2, associados ou não à GNPs, apresentaram incremento dos níveis de NGF, principalmente no córtex cerebral do camundongo, com efeito sinérgico significativo no grupo tratado com GNPs associadas ao DAP1-2. No hipocampo, apenas o grupo tratado com GNPs associadas ao DAP1-2 apresentou incremento dos níveis de NGF, o que pode ser explicado pela menor produção basal de NGF nesta estrutura, precisando de incremento ou redução nos seus níveis com maior amplitude para ter representatividade estatística, como descrito na literatura (Mittra et al., 2019). Desta forma, estes achados também indicam o efeito neuroprotetor mais eficaz no grupo tratado com GNPs associadas ao DAP1-2, demonstrando de forma inédita o potencial terapêutico do novo composto DAP1-2 na DA.

O experimento demonstrou uma diminuição dessas neurotrofinas tanto no córtex pré-frontal quanto no hipocampo no grupo β A₁₋₄₂, o que é concordante com o esperado para o

modelo de DA (Budni et al., 2017). De forma inédita, o tratamento com o peptídeo inibidor da IL1- β DAP1-2 demonstrou superioridade no incremento de neurotrofinas em relação às GNPs, tanto isoladamente quanto em associação com as GNPs, sendo que estas já apresentavam efeito neuroprotetor comprovado, e ressaltando o efeito sinérgico amplificado do DAP1-2 com GNPs (Tramontin et al., 2020).

Células da resposta imune inata, como micróglia e astrócitos, assim como células T da resposta imunológica adaptativa, estão claramente envolvidas na regulação fisiológica do humor, aprendizado, memória e atividade sináptica relacionada à experiência. Quaisquer alterações na homeostase cerebral que impliquem ativação da microglia e de astrócitos e/ou infiltrados de células T desencadeiam uma resposta inflamatória, que é um mecanismo de defesa cerebral e pode afetar a plasticidade sináptica. Na neuroinflamação, a micróglia ativada, o astrócito e o infiltrado linfocitário interagem especificamente com os neurônios e influenciam sua sobrevivência de forma positiva ou não, dependendo do contexto patológico, liberando citocinas, notadamente o TNF- α e a IL-1 β (Rizzo et al., 2018).

As GNPs desempenham uma função fundamental na polarização dos macrófagos e na redução da neuroinflamação. As GNPs no SNC induzem maior diferenciação da microglia inativa na forma ativada M2 (anti-inflamatória) em detrimento da forma ativada M1 (pró-inflamatória), com expressão de IL-10, BDNF e NGF aumentadas, modulando o processo inflamatório cerebral e favorecendo a neuroproteção e a regeneração sináptica, assim como a modulação de astrócitos ativados no ambiente inflamatório (Li et al., 2022; Aili et al., 2023).

O modelo fisiopatológico mais aceito da DA é pelo acúmulo e a agregação do peptídeo β A na matriz extracelular cerebral, com o hipocampo a principal área comprometida precocemente, este com papel central na função cognitiva de memória. O modelo propõe que o depósito de proteínas β A anômalas exercem precocemente na DA neuroinflamação, disfunção sináptica, perda neuronal e comprometimento cognitivo (Pisani et al., 2023).

O peptídeo β A é gerado a partir do processamento da proteína precursora amiloide (APP). Duas secretases, a γ -secretase e a β -secretase, clivam a APP em locais diferentes, resultando em fragmentos de β A de tamanhos variados, dentre os quais os mais relevantes para o processo fisiopatológico da DA são o β A₁₋₄₂ e o β A₁₋₄₀ (Zhao et al. 2020). Esses fragmentos têm a capacidade de se agregar, formando fibrilas que eventualmente levam à formação de placas senis. A formação dessas placas induz um processo de neuroinflamação, que por sua vez provoca disfunção mitocondrial, gerando um excesso de EROs e, conseqüentemente, a morte celular (Oliveira et al., 2021).

A partir do modelo consolidado patológico da DA pelos depósitos de placas β A

cerebrais, a indústria farmacêutica desenvolveu recentemente medicamentos modificadores da evolução natural da doença por destruição das placas β A através de anticorpos monoclonais contra estruturas β A (Wang et al., 2024). Apesar das medicações terem representado um grande avanço científico no tratamento da DA, algumas questões precisam ser esclarecidas ou melhor estudadas. Os medicamentos não interrompem o declínio cognitivo ou revertem os danos cerebrais. O que induz ao questionamento do tratamento da DA com ênfase apenas na redução de placas β A já formadas (Jin et al., 2024). Diversos especialistas em Alzheimer, também, expressam preocupação de que os riscos associados aos novos medicamentos que utilizam anticorpos monoclonais anti- β A não tenham sido plenamente avaliados ou compreendidos, especialmente quando se considera seus benefícios modestos. Com relatos de óbitos e diversos casos de hemorragia e edema cerebrais, o que não foi bem esclarecido nos ensaios clínicos, revelando possíveis efeitos colaterais graves ocultos (Dwivedi et al., 2024).

Diante de resultados clínicos discretos e questionáveis das atuais medicações modificadoras da evolução natural da doença, representadas unicamente pela classe dos anticorpos monoclonais anti-A β , com custos proibitivos e possíveis eventos adversos graves, explorar outras vias terapêuticas, incluindo medicamentos para reduzir a neuroinflamação e o estresse oxidativo, melhorar o fluxo sanguíneo cerebral e aumentar outros fatores neuroprotetores é promissor e necessário na busca de medidas terapêuticas eficientes na DA (Self et al., 2023).

A demonstração no experimento que houve redução da expressão gênica de APP nos grupos tratados revela uma possibilidade terapêutica promissora, tanto com a utilização de GNPs ou DAP1-2, sendo que a associação entre estas apresentou efeito sinérgico amplificado na redução da expressão gênica de APP, assim como o relatado na neuroproteção pelo incremento de neurotrofinas. Diferente dos medicamentos feitos com anticorpos monoclonais com ação exclusiva nas placas β A já formadas e extracelulares, um possível medicamento a base de GNPs associadas ao DAP1-2 agiria no bloqueio de uma etapa mais primordial da patogênese da DA, que é expressão gênica da APP, com redução desta e conseqüentemente redução de placas β A. Destacando que estes compostos, GNPs e DAP1-2, não foram testados clinicamente em humanos, necessitando desta forma de novos estudos para tais fins e para a elucidação da eficiência e segurança clínica destes compostos, apesar dos excelentes resultados em modelo animal (Beirão 2022; Casagrande 2023).

Nos últimos anos, a hipótese da patogênese amiloide intracelular como causa da DA, em sua fase ultra-precoce, ganhou relevância. Através de uma análise detalhada do

fosfoproteoma, identificou-se que a proteína pSer46-MARCKS (substrato de C-quinase rica em alanina miristilada) estava alterada antes da formação da agregação amiloide extracelular, resultando em necrose neuronal mais cedo do que o previsto pelo acúmulo de APP intracelular. A molécula HMGB1 liberada na necrose neuronal liga-se ao receptor toll-like 4, induzindo a fosforilação de MARCKS em pSer46-MARCKS por meio da ativação da proteína quinase C (Okazawa et al., 2021). Assim, pelos resultados no experimento de redução significativa da expressão gênica da APP, tanto pelas GNPs quanto pelo DAPI-2, e sinérgico potencializado quando estes são associados, indicam superioridade terapêutica na ação intracelular e precoce de combate a formação de β A, o que não ocorrem nos medicamentos que utilizam anticorpos monoclonais anti- β A, que agem somente no meio extracelular, o que talvez explique o sucesso limitado destes (Prakash et al., 2024).

A acumulação de β A pode acontecer em diversos compartimentos subcelulares, como endossomos, corpos multivesiculares, lisossomos, mitocôndrias, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e citosol. Apesar de terem sido identificados efeitos prejudiciais em processos fisiológicos específicos, como a interrupção da sinapse, a inibição do sistema ubiquitina-proteassoma, a disfunção mitocondrial e a ativação de respostas pró-inflamatórias, a natureza exata do mecanismo molecular que leva à toxicidade intraneuronal do β A ainda é um mistério (Huang et al., 2020).

Outro mecanismo inicial e intracelular na DA é a ferroptose. Esta é uma modalidade de morte celular controlada não apoptótica, marcada pelo acúmulo de peróxidos lipídicos dependentes de ferro. Esta forma de morte celular é mecanicamente sobreposta à oxitose, um programa de morte celular não apoptótica, que se caracteriza pela deficiência de glutathione (GSH), produção descontrolada de espécies reativas de oxigênio (ROS) e subsequente peroxidação lipídica, que potencializam o influxo de cálcio intracelular através de canais de cálcio por armazenamento e morte celular (Huang et al., 2020).

As nanopartículas de ouro apresentam fácil difusão celular e comprovada ação anti-inflamatória e antioxidante no SNC por meio da inibição das vias de sinalização MAPK, NF- κ B, JAK/STAT, ERK-1/2, IKK- α/β e outras vias, aliado à ativação da sinalização AMPK/Nrf2. A supressão da expressão de NF- κ B ocorre pela interação com a cisteína-179 do inibidor da subunidade beta da cinase kappa-B do fator nuclear (IKK- β), resultando na redução das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , além de PEG2, NO, iNOS, COX-2, e também das espécies reativas de oxigênio (ERO) e de espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Aili et al., 2023). GNPs e CUR têm uma alta tendência a aceitar elétrons e interagir com ERO para eliminá-los ou desativá-los, através do efeito scavenger (Casagrande et al., 2023).

Adicionalmente, as GNPs têm sido identificadas por interagir fisicamente com quimiocinas e citocinas, como a IL-1 β . Isso ocorre por meio da neutralização da ligação da IL-1 β ao seu receptor de membrana, impedindo a cadeia de sinalização pró-inflamatória. As GNPs têm a capacidade de promover uma diminuição considerável na interação entre leucócitos e endotélio. Essas moléculas penetram no tecido cerebral por meio da BHE, diminuindo a concentração de TNF- α e, indiretamente, inibindo a expressão ou atividade de NF κ B. A redução dos leucócitos polimorfonucleares circulantes nos tecidos resulta na diminuição da expressão de ICAM-1 nas células endoteliais, o que conseqüentemente suprime a adesão robusta dos neutrófilos à superfície endotelial. Isso leva a uma redução na resposta neuroinflamatória e tem efeitos positivos no tratamento da DA (Silveira et al., 2023).

Desta forma, as GNPs apresentam também mecanismos terapêuticos potencialmente vantajosos em relação aos medicamentos em uso comercial que utilizam anticorpos monoclonais anti- β A, modificadores da doença, como as já citadas ação anti-inflamatória e antioxidante no SNC, diretamente nos meios extracelular e intracelular, o que não ocorre com os outros medicamentos citados, notadamente a ação intracelular (de Bem et al., 2021). Estas características das GNPs são concordantes com os resultados do experimento, onde os grupos tratados exclusivamente com GNPs apresentaram redução significativa da expressão de APP no SNC e redução das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α no córtex cerebral.

Evidências crescentes indicam uma ligação entre disfunção neuronal e neuroinflamação na DA, mediada pela ativação crônica de astrócitos e células microgliais, além da produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, como IL-18, IL-6, IL-1 β , IFN γ , TNF- α e ativação dos receptores correlatos. Assim, compreender melhor a relação entre os sistemas nervoso e imunológico é crucial para atrasar ou prevenir os eventos neurodegenerativos associados à DA (Uddin et al., 2020).

Embora diversos medicamentos anti-inflamatórios tenham sido testados em ensaios clínicos para DA, a maioria não conseguiu apresentar resultados satisfatórios. Assim, a elevada taxa de insucesso no desenvolvimento desses medicamentos para o tratamento da DA em ensaios clínicos se deve, em parte, à nossa compreensão limitada do papel da neuroinflamação no desenvolvimento da doença (Sánchez-Sarasúa et al., 2020).

A falta de medicações para DA com enfoque na modulação terapêutica da neuroinflamação vai de encontro com os achados do experimento, onde ambos os grupos, tratados com GNPs ou com DAP1-2, apresentaram redução das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α e incremento da citocina pró-inflamatória IL-10, com destaque para o DAP1-2, que

reduziu os níveis de IL-1 β e TNF- α e aumentou os níveis de IL-10 no córtex cerebral, com efeito sinérgico amplificado no grupo tratado com GNPs associadas ao DAP1-2. No hipocampo, a resposta moduladora da neuroinflamação foi mais intrigante, onde apenas o grupo tratado com GNPs associadas ao DAP1-2, o que pode indicar que a estratégia terapêutica de uso de GNPs na neuroinflamação devem ser elaboradas com potencializadores da sua ação, com descrito na literatura (Casagrande, 2023).

O DAP1-2 foi desenvolvido para reduzir as reações provocadas pela IL-1 β , ao bloquear o receptor IL-1R1 e, dessa forma, evitar a ligação de IL-1 β (De-Pieri et al., 2024). Esta citocina é considerada essencial na neuroinflamação. O aumento excessivo de IL-1 β compromete a sinalização imunológica, ocorrendo assim um papel patogênico e agravante na fisiopatologia de diversas doenças inflamatórias, como na DA (Li et al., 2024). Vários medicamentos foram introduzidos no mercado com o objetivo de neutralizar a atividade biológica da IL-1 β por meio de diferentes mecanismos. Contudo, os inibidores de IL-1 β atualmente disponíveis são proteínas recombinantes, que apresentam alto custo de produção e estabilidade limitada. O composto DAP1-2 se destaca como um inibidor promissor de IL-1, devido à sua natureza não tóxica, estabilidade, facilidade de produção e relação custo-benefício possibilitada pelo uso de peptídeos sintéticos. Foi demonstrado que o DAP1-2 apresentou redução significativa nos níveis de IL-1 β e na sua expressão gênica em um modelo de validação em análises *in vitro* (De-Pieri et al., 2024).

Também se destaca no experimento a utilização da via intranasal devido a aplicação de fármacos no SNC apresentar desafios devido às restrições impostas pela BHE. A administração intranasal de medicamentos é uma estratégia eficaz para superar os desafios impostos pela BHE, sendo uma alternativa interessante por sua natureza não invasiva. Vários estudos realizados em animais e humanos comprovaram que diversos princípios farmacológicos ativos podem chegar diretamente ao cérebro após a administração intranasal, como as GNPs e peptídeos, a exemplo da DAP1-2 (Veronesi et al., 2020).

Os resultados apresentados indicaram a melhora nos aspectos comportamentais e bioquímicos do modelo experimental de DA executado. Isso ocorre devido aos benefícios neuroprotetores das terapias, que melhoram a função cognitiva, reduzem citocinas pró-inflamatórias, elevam fatores neurotróficos e citocina anti-inflamatória. Por se tratar de composto novo e de uso inédito tanto para um modelo de DA quanto por via intranasal, a biossegurança do DAP1-2 foi testada no experimento com diversos marcadores no fígado para hepatotoxicidade, descritos anteriormente, com nenhuma alteração hepática significativa, o que indica o perfil terapêutico seguro do composto, apesar da necessidade futura de mais estudos

para esta finalidade.

Cabe ainda ressaltar que existem vários modelos já testados para entender como a DA se manifesta e progride. Abrange desde vermes até moscas-da-fruta, passando por peixes e outros primatas, como lêmures e algumas variedades de macaco. Contudo, nenhum simula fielmente e integralmente o que acontece no cérebro humano (Grieb, 2016). Em roedores, principalmente camundongos e ratos, são modelos frequentemente empregados os que injetam diretamente no cérebro substâncias neurotóxicas, como a estreptozotocina e o peptídeo βA_{1-42} (Budni et al., 2017). Porém há também modelos com camundongos transgênicos, como o hA β -KI, 5xFAD e APP/PS1, que tentam simular doença de Alzheimer precoce e tardia ou esporádica (De Bastiani et. Al, 2024).

Assim, as terapias isoladas apresentaram melhora significativa nos testes de memória de curto prazo, porém apenas os compostos associados apresentaram melhoras também na memória de longo prazo, o que foi corroborado com os parâmetros bioquímicos, onde também houve superioridade do grupo que foi tratado com ambos os compostos (grupo βA_{1-42} +GNPs+DAPI-2). Desta forma, indicando o efeito sinérgico potencializado e seguro em possível terapia para DA quando os compostos estão associados.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a melhora dos parâmetros comportamentais e bioquímicos em um modelo experimental de DA induzido por βA_{1-42} ICV quando tratado com nanopartículas de ouro ou com o peptídeo inibidor de IL1- β DAP1-2, de forma isolada ou em associação, indicando os significativos efeitos neuroprotetores destes compostos, principalmente pelo efeito terapêutico sinérgico potencializado quando utilizados associados.

Frente aos atuais medicamentos modificadores da evolução natural da DA aprovados para uso clínico, representados unicamente pela classe dos anticorpos monoclonais anti- βA , que possuem severas limitações terapêuticas e graves eventos adversos, os compostos utilizados no experimento, GNPs e DAP1-2, podem representar alternativa terapêutica promissora na DA por agir na sua fase inicial, anterior a formação extracelular de placas βA , e *continuum*, reduzindo a neuroinflamação e a expressão gênica da APP.

O peptídeo inibidor de IL1- β DAP1-2, desenvolvido no Laboratório de Fisiopatologia Experimental da Universidade do Extremo Sul Catarinense (Criciúma/SC, Brasil), apresentou segurança toxicológica e consolidou a importância terapêutica do bloqueio do receptor de IL-1 na DA. Sendo este, o primeiro estudo a utilizar DAP1-2 em um modelo experimental de DA.

Entretanto, apesar de todos os excepcionais resultados do experimento, mais estudos são necessários para estabelecer, com maiores detalhes e robustez de evidências científicas, todos os aspectos bioquímicos ou fisiopatológicos da interação destes compostos em modelo experimental, para possíveis estudos clínicos futuros em DA.

REFERÊNCIAS

Abbate A, Toldo S, Marchetti C, Kron J, Van-Tasseli BW, Dinarello CA. Interleukin-1 and the Inflammasome as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 2020;126:1260-1280.

Abdelkader NF, El-Batal AI, Amin YM, Hawas AM, Hassan SH, Eid NI. Neuroprotective effect of gold nanoparticles and alpha-lipoic acid mixture against radiation-induced brain damage in rats. *International Journal of Molecular Sciences.* 2022 Aug 25;23(17):9640.

Abeyasinghe AA, Deshapriya RD, Udawatte C. Alzheimer's disease; a review of the pathophysiological basis and therapeutic interventions. *Life sciences.* 2020 Sep 1;256:117996.

Abubakar MB, Sanusi KO, Ugusman A, Mohamed W, Kamal H, Ibrahim NH, Khoo CS, Kumar J. Alzheimer's disease: an update and insights into pathophysiology. *Frontiers in aging neuroscience.* 2022 Mar 30;14:742408.

Aili M, Zhou K, Zhan J, Zheng H, Luo F. Anti-inflammatory role of gold nanoparticles in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Materials Chemistry B.* 2023;11(36):8605-21.

Apelt, J., Mehlhorn, G. & Schliebs, R. Insulin-sensitive GLUT4 glucose transporters are colocalized with GLUT3-expressing cells and demonstrate a chemically distinct neuron-specific localization in rat brain. *J. Neurosci. Res.* 57, 693–705 (1999).

Aprahamian I, Martinelli JE, Neri AL, Yassuda MS. The Clock Drawing Test A review of its accuracy in screening for dementia. *Dementia & neuropsychologia.* 2009 Apr;3:74-80.

Austin, S. A., d'Uscio, L. V., and Katusic, Z. S. (2013). Supplementation of nitric oxide attenuates AbetaPP and BACE1 protein in cerebral microcirculation of eNOS-deficient mice. *Journal of Alzheimer's disease* 33, 29–33. doi: 10.3233/jad-2012-121351

Austin, S. A., and Katusic, Z. S. (2020). Partial loss of endothelial nitric oxide leads to increased cerebrovascular beta amyloid. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 40, 392–403. doi:10.1177/0271678x18822474

Azman KF, Zakaria R. Recent advances on the role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in neurodegenerative diseases. *International journal of molecular sciences.* 2022 Jun 19;23(12):6827.

AZM, S. A. N. et al. Lactobacilli and bifidobacteria ameliorate memory and learning deficits and oxidative stress in β -amyloid (1–42) injected rats. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 2018.

Bai R, Guo J, Ye XY, Xie Y, Xie T. Oxidative stress: The core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease. *Ageing research reviews.* 2022 May 1;77:101619.

Banks, W. A., Owen, J. B. & Erickson, M. A. Insulin in the brain: there and back again. *Pharmacol. Ther.* 136, 82–93 (2012).

Budni J, Feijó DP, Batista-Silva H, Garcez ML, Mina F, Belletini-Santos T, Krasilchik LR, Luz AP, Schiavo GL, Quevedo J. Lithium and memantine improve spatial memory impairment and neuroinflammation induced by β -amyloid 1-42 oligomers in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2017; 141:84-92.

Bauer V, Sotníková R. Nitric oxide—the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions. *General physiology and biophysics.* 2010 Dec 1;29(4):319.

Bettens, K., Sleegers, K., Van Broeckhoven, C., 2010. Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Hum. Mol. Genet.* 19, R4–R11.

Beauchesne, E., Desjardins, P., Hazell, A. S., and Butterworth, R. F. (2009). eNOS gene deletion restores blood-brain barrier integrity and attenuates neurodegeneration in the thiamine-deficient mouse brain. *J. Neurochem.* 111, 452–459. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06338.x

Beirão ME. Plasma rico em plaquetas e peptídeo inibidor de IL1- β atenuam o processo inflamatório de lesão muscular em ratos wistar. [Dissertação de Mestrado]. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2022

Banerjee M, Shenoy RR. Emphasizing roles of BDNF promoters and inducers in Alzheimer's disease for improving impaired cognition and memory. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 2023 Mar 16;34(2):125-36.

Bernstein, D. L., Zuluaga-Ramirez, V., Gajghate, S., Reichenbach, N. L., Polyak, B., Persidsky, Y., et al. (2020). miR-98 reduces endothelial dysfunction by protecting blood-brain barrier (BBB) and improves neurological outcomes in mouse ischemia/reperfusion stroke model. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 40, 1953–1965. doi: 10.1177/0271678x19882264

Better MA. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2023;19(4):1598-695.

Blokland A, Jolles J. Spatial-learning deficit and reduced hippocampal chat activity in rats after an Icv injection of streptozotocin. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1993 Feb 1;44(2):491-4.

Bose, G., Graveline, J., Yogendrakumar, V., Fergusson, D., and Dowlatshahi, D. (2019). Direct oral anticoagulants in treatment of cerebral venous thrombosis: a systematic review protocol. *Syst. Rev.* 8, 1–4.

Brejyeh Z, Karaman R. Comprehensive review on Alzheimer's disease: Causes and treatment. molecules. Basel, Switzerland. 2020;25.

Cai Y, Liu J, Wang B, Sun M, Yang H. Microglia in the neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease and related therapeutic targets. *Front Immunol* 13: 856376. 2022.

Calabrò M, Rinaldi C, Santoro G, Crisafulli C. The biological pathways of Alzheimer disease: A review. *AIMS neuroscience*. 2021;8(1):86.

Casagrande LD. Efeitos do tratamento com ultrassom pulsado de baixa intensidade transcraniano associado às nanopartículas de ouro em um modelo de doença de Alzheimer. 2023.

Casagrande LD, Porto GD, Colares MC, Venturini LM, Silveira GD, Mendes C, Corrêa ME, Lima IR, Feuser PE, Machado-de-Ávila RA, Silveira PC. Green synthesis of gold nanoparticles modulates lipopolysaccharide-induced lung inflammation in Wistar rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2023 Jun;132(6):472-84.

Chiang MC, Nicol CJ, Cheng YC, Yen C, Lin CH, Chen SJ, Huang RN. Nanogold neuroprotection in human neural stem cells against amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction. *Neuroscience*. 2020 May 21;435:44-57.

Chiang MC, Yang YP, Nicol CJ, Wang CJ. Gold nanoparticles in neurological diseases: A review of neuroprotection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024 Feb 17;25(4):2360.

Clarke, D. W., Boyd, F. T. Jr., Kappy, M. S. & Raizada, M. K. Insulin binds to specific receptors and stimulates 2-deoxy-D-glucose uptake in cultured glial cells from rat brain. *J. Biol. Chem.* 259, 11672–11675 (1984).

Craft S, Watson GS. Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *Lancet Neurol*. 2004;3:169–78.

Carrano, A., Hoozemans, J. J., Van Der Vies, S. M., Van Horssen, J., De Vries, H. E., and Rozemuller, A. J. (2012). Neuroinflammation and blood-brain barrier changes in capillary amyloid angiopathy. *Neurodegen. Dis.* 10, 329–331. doi: 10.1159/000334916

Cengiz, M., Yavuzer, S., Kılıçkiran Avcı, B., Yürüyen, M., Yavuzer, H., Dikici, S. A., et al. (2015). Circulating miR-21 and eNOS in subclinical atherosclerosis in patients with hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* 37, 643–649. doi: 10.3109/ 10641963.2015.1036064

Chen, H., Dorrigan, A., Saad, S., Hare, D. J., Cortie, M. B., & Valenzuela, S. M. (2013). In Vivo Study of Spherical Gold Nanoparticles: Inflammatory Effects and Distribution in Mice. *PLoS ONE*, 8(2). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0058208>.

Chiang MC, Yang YP, Nicol CJ, Wang CJ. Gold nanoparticles in neurological diseases: A review of neuroprotection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024 Feb 17;25(4):2360.

Cui, Q. L. et al. Response of human oligodendrocyte progenitors to growth factors and axon signals. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69, 930–944 (2010).

D’Onofrio, G., Sancarolo, D., Ruan, Q., Yu, Z., Panza, F., Daniele, A., Greco, A., Seripa, D., 2017. Phytochemicals in the treatment of Alzheimer’s disease: a systematic review. *Current Drug Targets* 18 (13), 1487–1498.

De Felice, F. G. Alzheimer’s disease and insulin resistance: translating basic science into clinical applications. *J. Clin. Invest.* 123, 531–539 (2013).

de Bem Silveira G, Muller AP, Machado-de-Ávila RA, Silveira PC. Advance in the use of gold nanoparticles in the treatment of neurodegenerative diseases: new perspectives. *Neural Regeneration Research*. 2021 Dec 1;16(12):2425-6.

De la Monte, S. M. Therapeutic targets of brain insulin resistance in sporadic Alzheimer’s disease. *Front. Biosci. (Elite Ed.)* 4, 1582–1605 (2012).

De-Pieri E, Zaccaron RP, Mezzari CG, Cardoso MD, De Roch Casagrande L, Silveira PC, Machado-de-Ávila RA. DAP1-2: a synthetic peptide targeting IL-1R1 receptor effectively suppresses IL-1 β in vitro. *Immunologic Research*. 2024 May 2:1-9.

De-Pieri E. Predição in silico e validação in vitro de peptídeos antagonistas do receptor IL1- β . [Dissertação de Mestrado]. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2022.

Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2018;281:8-27.

Dinarello CA, Van-Der-Meer JWM. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin Immunol.* 2013;25:469-484.

Dong, Z.-C., Wu, M.-M., Zhang, Y.-L., Wang, Q.-S., Liang, C., Yan, X., et al.(2020). The vascular endothelial growth factor trap aflibercept induces vascular dysfunction and hypertension via attenuation of eNOS/NO signaling in mice. *Acta Pharmacol. Sin.* doi: 10.1038/s41401-020-00569-1 [Epub ahead of print].

dos Santos Tramontin N, da Silva S, Arruda R, Ugioni KS, Canteiro PB, de Bem Silveira G, Mendes C, Silveira PC, Muller AP. Gold nanoparticles treatment reverses brain damage in Alzheimer's disease model. *Molecular neurobiology.* 2020 Feb;57:926-36.

Dubois B, Villain N, Frisoni GB, Rabinovici GD, Sabbagh M, Cappa S, Bejanin A, Bombois S, Epelbaum S, Teichmann M, Habert MO. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: recommendations of the International Working Group. *The Lancet Neurology.* 2021 Jun 1;20(6):484-96.

Dwivedi AK, Abanto J, Schneider LS, Herrup K, Schrag M, Widera E, Mahajan A, Howard R, Espay AJ. Excess Mortality in Alzheimer's Patients on Anti-A β Monoclonal Antibodies. 2024.

Foidl, B. M., Oberacher, H., Marksteiner, J., and Humpel, C. (2020). Platelet and plasma phosphatidylcholines as biomarkers to diagnose cerebral amyloid angiopathy. *Front. Neurol.* 11:359. doi: 10.3389/fneur.2020.00359

Folstein M, Folstein S, McHugh P. 5.2 Mini-Mental State Examination (MMSE). *Manual of Screeners for Dementia.* 2020;51.

Gao L, Zhang Y, Sterling K, Song W. Brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer's disease and its pharmaceutical potential. *Translational neurodegeneration.* 2022 Jan 28;11(1):4.

Garcez ML, Mina F, Bellettini-Santos T, Carneiro FG, Luz AP, Schiavo GL, Andrighetti MS, Scheid MG, Bolfe RP, Budni J. Minocycline reduces inflammatory parameters in the brain structures and serum and reverses memory impairment caused by the administration of amyloid β (1-42) in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017; 3;77:23-31

García-Morales V, González-Acedo A, Melguizo-Rodríguez L, Pardo-Moreno T, Costela-Ruiz VJ, Montiel-Troya M, Ramos-Rodríguez JJ. Current understanding of the physiopathology, diagnosis and therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Biomedicines*. 2021 Dec 14;9(12):1910.

Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The Interleukin-1 Family: Back To The Future. *Immunity*. 2013;39:1003-1018

Gao X, Zhang X, Sun Y, Dai X. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation and its role in Alzheimer's disease. *Exploration of Immunology*. 2022 May 7;2(3):229-44.

Goldstein, B. J. Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol*. 90, 3G–10G (2002).

Guglielmotto, M., Aragno, M., Autelli, R., Giliberto, L., Novo, E., Colombatto, S., Danni, O., Parola, M., Smith, M.A., Perry, G., 2009. The up-regulation of BACE1 mediated by hypoxia and ischemic injury: role of oxidative stress and HIF1 α . *J. Neurochem*. 108, 1045–1056.

Gustavsson A, Norton N, Fast T, Frölich L, Georges J, Holzappel D, Kirabali T, Krolak-Salmon P, Rossini PM, Ferretti MT, Lanman L. Global estimates on the number of persons across the Alzheimer's disease continuum. *Alzheimer's & Dementia*. 2023 Feb;19(2):658-70.

Haselden, W. D., Kedarasetti, R. T., and Drew, P. J. (2020). Spatial and temporal patterns of nitric oxide diffusion and degradation drive emergent cerebrovascular dynamics. *PLoS Comput. Biol*. 16:e1008069. doi: 10.1371/ journal.pcbi.1008069

Hallschmid M. Intranasal insulin for Alzheimer's disease. *CNS drugs*. 2021 Jan;35(1):21-37.

Hartman, R.E., Ross, D.M., 2018. Effects and mechanisms of actions of phytochemicals

on Alzheimer's disease neuropathology. *Neuropathology* 4, 19.

Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, Griep A, Axt D, Remus A, Tzeng TC, Gelpi E. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*. 2013 Jan 31;493(7434):674-8.

Heni, M. et al. Insulin promotes glycogen storage and cell proliferation in primary human astrocytes. *PLoS ONE* 6, e21594 (2011).

Hernández-Zimbrón LF, Rivas-Arancibia S. Deciphering an interplay of proteins associated with amyloid β 1-42 peptide and molecular mechanisms of Alzheimer's disease. *Reviews in the Neurosciences*. 2014 Dec 1;25(6):773-83.

Henquin, J. C. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* 52, 739–751 (2009).

Huang L, McClatchy DB, Maher P, Liang Z, Diedrich JK, Soriano-Castell D, Goldberg J, Shokhirev M, Yates III JR, Schubert D, Currais A. Intracellular amyloid toxicity induces oxytosis/ferroptosis regulated cell death. *Cell death & disease*. 2020 Oct 6;11(10):828.

Hwang, S., and Kim, J.-K. (2018). Effects of NADPH oxidase inhibitors and mitochondria-targeted antioxidants on amyloid β 1-42-induced neuronal deaths in mouse mixed cortical cultures. *Chonnam Med. J.* 54:159. doi: 10.4068/cmj.2018.54.3.159

Iadecola, C. (2017). The neurovascular unit coming of age: a journey through neurovascular coupling in health and disease. *Neuron* 96, 17–42. doi: 10.1016/j.neuron.2017.07.030

Jin M, Noble JM. What's in It for Me? Contextualizing the Potential Clinical Impacts of Lecanemab, Donanemab, and Other Anti- β -amyloid Monoclonal Antibodies in Early Alzheimer's Disease. *eneuro*. 2024 Sep 1;11(9).

Jurcovicova, J. Glucose transport in brain - effect of inflammation. *Endocr. Regul.* 48, 35–48 (2014).

Lee JY, Sooyeon K, Yoo HB, Park S, Choi JS, Kwon JS, Cha KR, Jung HY. Spatial memory impairments in amnesic mild cognitive impairment in a virtual radial arm maze. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2014; 653-660.

Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?. *Nature Reviews Neurology*. 2021 Mar;17(3):157-72.

Li C, Zhang X, Wang Y, Cheng L, Li C, Xiang Y. The role of IL-1 family of cytokines in the pathogenesis and therapy of Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology*. 2024 Oct;32(5):2681-94.

Liu D, Liu J, Sun D, Alcock NW, Wen J. Spinal cord injury increases iron levels: catalytic production of hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med*. 2003;3:64–71.

Lou-Franco J, Das B, Elliott C, Cao C. Gold nanozymes: from concept to biomedical applications. *Nano-Micro Letters*. 2021 Dec;13:1-36.

Luís JP, Simões CJ, Brito RM. The therapeutic prospects of targeting IL-1R1 for the modulation of neuroinflammation in central nervous system disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Feb 2;23(3):1731.

Kanwar, J. R., Sun, X., Punj, V., Sriramoju, B., Mohan, R. R., Zhou, S.-F., Kanwar, R. K. (2012). Nanoparticles in the treatment and diagnosis of neurological disorders: untamed dragon with fire power to heal. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(4), 399–414. <http://doi.org/10.1016/j.nano.2011.08.006>.

Kane M. Lecanemab Therapy and APOE Genotype. *Medical Genetics Summaries* [Internet]. 2024 Aug 12.

Kim, H.J., Lim, T.S., Lee, S.M., Kim, T.-S., Kim, Y., An, Y.-S., Youn, Y.C., Park, S.A., Chang, J., Moon, S.Y., 2019. Cerebrospinal fluid levels of β -amyloid 40 and β -amyloid 42 are proportionately decreased in amyloid positron-emission tomography negative idiopathic normal-pressure hydrocephalus patients. *J. Clin. Neurol*. 15, 353–359.

Kim, S. J. & Han, Y. Insulin inhibits AMPA-induced neuronal damage via stimulation of protein kinase B (Akt). *J. Neural Transm. (Vienna)* 112, 179–191 (2005).

Kim S, Nam Y, Kim HS, Jung H, Jeon SG, Hong SB, Moon M. Alteration of neural pathways and its implications in Alzheimer's disease. *Biomedicines*. 2022 Apr 4;10(4):845.

KIGERL, K. A. et al. Pattern recognition receptors and central nervous system repair *Experimental Neurology*, 2014.

Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, Nixon RA, Jones DT. Alzheimer disease. *Nature reviews Disease primers*. 2021 May 13;7(1):33.

Kovacs, G.G., 2018. Tauopathies. *Handb. Clin. Neurol.* 145, 355–368.

Ko, A. R., Kim, J. Y., Hyun, H. W., and Kim, J. E. (2015). Endothelial NOS activation induces the blood-brain barrier disruption via ER stress following status epilepticus. *Brain Res.* 1622, 163–173. doi: 10.1016/j.brainres.2015.06.020

Ko WC, Shieh JM, Wu WB. P38 MAPK and Nrf2 activation mediated naked gold nanoparticle induced heme oxygenase-1 expression in rat aortic vascular smooth muscle cells. *Archives of Medical Research*. 2020 Jul 1;51(5):388-96.

Komori, T. et al. Subcellular localization of glucose transporter 4 in the hypothalamic arcuate nucleus of ob/ob mice under basal conditions. *Brain Res.* 1049, 34–42 (2005).

Koval I, Bône A, Louis M, Lartigue T, Bottani S, Marcoux A, Samper-Gonzalez J, Burgos N, Charlier B, Bertrand A, Epelbaum S. AD Course Map charts Alzheimer's disease progression. *Scientific Reports*. 2021 Apr 13;11(1):8020.

Kunkle, B.W., Schmidt, M., Klein, H.-U., Naj, A.C., Hamilton-Nelson, K.L., Larson, E.B., Evans, D.A., De Jager, P.L., Crane, P.K., Buxbaum, J.D., 2021. Novel Alzheimer disease risk loci and pathways in African American individuals using the African genome resources panel: a meta-analysis. *JAMA neurol* 78, 102–113.

Kuhla, A., Ludwig, S.C., Kuhla, B., Münch, G., Vollmar, B., 2015. Advanced glycation end products are mitogenic signals and trigger cell cycle reentry of neurons in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Aging* 36, 753–761.

Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, Nixon RA, Jones DT. Alzheimer disease. *Nature reviews Disease primers*. 2021 May 13;7(1):1-21.

Lazarević-Pašti T. Side Effects of Alzheimer's Disease Treatment. *Current Medicinal Chemistry*. 2023 Jul 1;30(24):2705-9.

Lee, C. C., Huang, C. C. & Hsu, K. S. Insulin promotes dendritic spine and synapse formation by the PI3K/Akt/mTOR and Rac1 signaling pathways. *Neuropharmacology* 61, 867–879 (2011).

Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?. *Nature Reviews Neurology*. 2021 Mar;17(3):157-72.

Li, X., Wang, H.-F., Li, X.-X., and Xu, M. (2019). Contribution of acid sphingomyelinase to angiotensin II-induced vascular adventitial remodeling via membrane rafts/Nox2 signal pathway. *Life Sci*. 219, 303–310. doi: 10.1016/j.lfs.2019.01.028

Liddel SA, Barres BA. Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential. *Immunity*. 2017 Jun 20;46(6):957-67.

Ling, L., Chen, D., Tong, Y., Zang, Y.-H., Ren, X.-S., Zhou, H., et al. (2018). Fibronectin type III domain containing 5 attenuates NLRP3 inflammasome activation and phenotypic transformation of adventitial fibroblasts in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens*. 36, 1104–1114. doi: 10.1097/hjh.0000000000001654

Liu D, Liu J, Sun D, Alcock NW, Wen J. Spinal cord injury increases iron levels: catalytic production of hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med*. 2003;3:64–71.

Lochhead JJ, Thorne RG. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Advanced drug delivery reviews*. 2012 May 15;64(7):614-28.

Lou-Franco J, Das B, Elliott C, Cao C. Gold nanozymes: from concept to biomedical applications. *Nano-Micro Letters*. 2021 Dec;13:1-36.

Luís JP, Simões CJ, Brito RM. The therapeutic prospects of targeting IL-1R1 for the modulation of neuroinflammation in central nervous system disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Feb 2;23(3):1731.

Lueshen, E., Venugopal, I., Soni, T., Alaraj, A., & Linninger, A. (2015). Implant-Assisted Intrathecal Magnetic Drug Targeting to Aid in Therapeutic Nanoparticle Localization for Potential Treatment of Central Nervous System Disorders. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11(2), 253–261. <http://doi.org/10.1166/jbn.2015.1907>.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group* under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984 Jul;34(7):939-.

MacKnight, C., Rockwood, K., Awalt, E. & McDowell, I. Diabetes mellitus and the risk of dementia, Alzheimer's disease and vascular cognitive impairment in the Canadian Study of Health and Aging. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 14, 77–83 (2002).

Madnani RS. Alzheimer's disease: A mini-review for the clinician. *Frontiers in Neurology*. 2023 Jun 22;14:1178588.

McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack Jr CR, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia*. 2011 May 1;7(3):263-9.

Malkov, A., Popova, I., Ivanov, A., Jang, S.-S., Yoon, S. Y., Osypov, A., et al. (2020). Aβ-induced NOX2 activation underlies oxidative stress leading to brain hypometabolism and hyperactivity in Alzheimer's disease. *bioRxiv [Preprint]* doi: 10.1101/2020.08.12.248492

Mayer G, Nitsch R, Hoyer S. Effects of changes in peripheral and cerebral glucose metabolism on locomotor activity, learning and memory in adult male rats. *Brain research*. 1990 Nov 5;532(1-2):95-100.

Mayhan, W. G., Scott, J. P., and Arrick, D. M. (2015). Influence of type 1 diabetes on basal and agonist-induced permeability of the blood-brain barrier. *Physiol. Rep.* 3:e12653. doi: 10.14814/phy2.12653

Mayeux R, Stern Y. Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012 Aug 1;2(8):a006239.

Marano, C. M. et al. The relationship between fasting serum glucose and cerebral glucose metabolism in late-life depression and normal aging. *Psychiatry Res.* 222, 84–90 (2014).

Mendes C, Zaccaron RP, Casagrande LD, Venturini LM, da Costa C, Lima IR, Wermuth TB, Arcaro S, Feuser PE, Lock Silveira PC. Green synthesis of gold nanoparticles in an animal model of chronic wound induced with Resiquimod. *Journal of Drug Targeting*. 2024 Oct 20;32(9):1086-100.

Meraz-Ríos MA, Toral-Rios D, Franco-Bocanegra D, Villeda-Hernández J, Campos-Peña V. Inflammatory process in Alzheimer's Disease. *Frontiers in integrative neuroscience*. 2013 Aug 13;7:59.

Mielke, J. G. et al. A biochemical and functional characterization of diet-induced brain insulin resistance. *J. Neurochem.* 93, 1568–1578 (2005).

Mitra S, Behbahani H, Eriksson M. Innovative therapy for Alzheimer's disease-with focus on biodelivery of NGF. *Frontiers in neuroscience*. 2019 Feb 5;13:38.

Moran, C. et al. Type 2 diabetes mellitus and biomarkers of neurodegeneration. *Neurology* 85, 1123–1130 (2015).

Muller AP, Ferreira GK, Pires AJ, de Bem Silveira G, de Souza DL, de Abreu Brandolfi J, de Souza CT, Paula MM, Silveira PC. Gold nanoparticles prevent cognitive deficits, oxidative stress and inflammation in a rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type. *Materials Science and Engineering: C*. 2017 Aug 1;77:476-83.

Nie Z, Liu KJ, Zhong CJ, Wang LF, Yang Y, Tian Q, Liu Y. Enhanced radical scavenging activity by antioxidant-functionalized gold nanoparticles: a novel inspiration for development of new artificial antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007 Nov 1;43(9):1243-54.

Nasrolahi A, Javaherforooshzadeh F, Jafarzadeh-Gharehziaaddin M, Mahmoudi J, Asl KD, Shabani Z. Therapeutic potential of neurotrophic factors in Alzheimer's Disease. *Molecular biology reports*. 2022 Mar 1:1-3.

Nitsch R, Mayer G, Hoyer S. The intracerebroventricular streptozotocin-treated rat: impairment of cerebral glucose metabolism resembles the alterations of carbohydrate metabolism of the brain in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission-Parkinson's Disease and Dementia Section*. 1989 Mar;1(1):109-10.

Nosenko MA, Ambaryan SG, Drutskaya MS. Proinflammatory cytokines and skin wound healing in mice. *Mol Biol*. 2019;53:741-754.

Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *Journal of neurochemistry*. 2004 Feb;88(4):844-56.

Okazawa H. Intracellular amyloid hypothesis for ultra-early phase pathology of Alzheimer's disease. *Neuropathology*. 2021 Apr;41(2):93-8.

Ostendorf, B.N., Bilanovic, J., Adaku, N., Tafreshian, K.N., Tavora, B., Vaughan, R.D., Tavazoie, S.F., 2020. Common germline variants of the human APOE gene modulate melanoma progression and survival. *Nat. Med.* 26, 1048–1053.

Panday, A., Sahoo, M. K., Osorio, D., and Batra, S. (2015). NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell. Mol. Immunol.* 12, 5–23. doi: 10.1038/cmi.2014.89

Pang Y, Lin S, Wright C, Shen J, Carter K, Bhatt A, et al. Intranasal insulin protects against substantia nigra dopaminergic neuronal loss and alleviates motor deficits induced by 6-OHDA in rats. *Neuroscience.* 2016;318:157–65.

Park SB, Cho HJ, Moon SR, Choi KJ, Jung WH, Kim KY, Koh B. Gold nanoparticle-assisted delivery of brain-derived neurotrophic factor to cerebral organoids. *Nano Research.* 2022 Apr 1:1-7.

Paula MM, Petronilho F, Vuolo F, Ferreira GK, De Costa L, Santos GP, Effting PS, Dal-Pizzol F, Dal-Bó AG, Frizon TE, Silveira PC, Pinho RA. Gold nanoparticles and/or N-acetylcysteine mediate carrageenan-induced inflammation and oxidative stress in a concentration-dependent manner. *J Biomed Mater Res A.* 2015 Oct;103(10):3323-30.

Pearson-Leary, J. & McNay, E. C. Novel roles for the insulin-regulated glucose transporter-4 in hippocampally dependent memory. *J. Neurosci.* 36, 11851–11864 (2016).

Peineau, S. et al. LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3 β . *Neuron* 53, 703–717 (2007).

Pérez-Torres I, Manzano-Pech L, Rubio-Ruíz ME, Soto ME, Guarner-Lans V. Nitrosative stress and its association with cardiometabolic disorders. *Molecules.* 2020 May 31;25(11):2555.

Perlmutter, L. C. et al. Decreased cognitive function in aging non-insulin-dependent diabetic patients. *Am. J. Med.* 77, 1043–1048 (1984).

Pisani A, Paciello F, Del Vecchio V, Malesci R, De Corso E, Cantone E, Fetoni AR. The role of BDNF as a biomarker in cognitive and sensory neurodegeneration. *Journal of Personalized Medicine.* 2023 Apr 10;13(4):652.

Pinho RA, Haupenthal DP, Fauser PE, Thirupathi A, Silveira PC. Gold Nanoparticle-Based Therapy for Muscle Inflammation and Oxidative Stress. *J. Inflamm. Res.* 2022; 15:3219.

Prakash R, Jayaraman R, Palei NN, Jose Prakash D, Ronald D. A Comprehensive Review on the Newer Therapeutic Approaches in Treating Alzheimer's Disease. *Handbook of Neurodegenerative Disorders.* 2024 Mar 15:1-39.

Quiroga C, Chaparro RE, Karlinski R, Erasso D, Gordon M, Morgan D, Bosco G, Rubini A, Parmagnani A, Paoli A, Mangar D, Camporesi EM. Effects of repetitive exposure to anesthetics and analgesics in the Tg2576 mouse Alzheimer's model. *Neurotox Res.* 2014; 26(4):414-21.

Rao YL, Ganaraja B, Murlimanju BV, Joy T, Krishnamurthy A, Agrawal A. Hippocampus and its involvement in Alzheimer's disease: a review. *3 Biotech.* 2022 Feb;12(2):55.

Retinasamy T, Shaikh MF. Interleukin 1 receptor antagonist and neurodegenerative diseases: the future treatment strategy. *Neuroscience Research Notes.* 2023 Feb 11;6(1):164-.

Rizzo FR, Musella A, De Vito F, Fresegna D, Bullitta S, Vanni V, Guadalupi L, Stampanoni Bassi M, Buttari F, Mandolesi G, Centonze D. Tumor necrosis factor and interleukin-1 β modulate synaptic plasticity during neuroinflammation. *Neural plasticity.* 2018;2018(1):8430123.

Rotermund, C., Truckenmuller, F. M., Schell, H. & Kahle, P. J. Diet-induced obesity accelerates the onset of terminal phenotypes in alpha-synuclein transgenic mice. *J. Neurochem.* 131, 848–858 (2014).

Sajad, Mohd, Rajesh Kumar, and Sonu Chand Thakur. "History in Perspective: The Prime Pathological Players and Role of Phytochemicals in Alzheimer's Disease." *IBRO Neuroscience Reports* (2022).

Sánchez-Sarasúa S, Fernández-Pérez I, Espinosa-Fernández V, Sánchez-Pérez AM, Ledesma JC. Can we treat neuroinflammation in Alzheimer's disease?. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020 Nov 19;21(22):8751.

Sani A, Cao C, Cui D. Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): A review. *Biochemistry and biophysics reports*. 2021 Jul 1;26:100991.

Säterborg, N.-E. (1973). The Distribution of ¹⁹⁸Au Injected Intravenously as a Colloid and in Solution. *Acta Oncologica*, 12(6), 509–528. <http://doi.org/10.3109/02841867309130417>.

Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, Cummings J, van der Flier WM. Alzheimer's disease. *The Lancet*. 2021 Apr 24;397(10284):1577-90.

Sela, H., Cohen, H., Elia, P., Zach, R., Karpas, Z., & Zeiri, Y. (2015). Spontaneous penetration of gold nanoparticles through the blood brain barrier (BBB). *Journal of Nanobiotechnology*, 13(1), 71. <http://doi.org/10.1186/s12951-015-0133-1>.

Self WK, Holtzman DM. Emerging diagnostics and therapeutics for Alzheimer disease. *Nature medicine*. 2023 Sep;29(9):2187-99.

Selkoe DJ. The advent of Alzheimer treatments will change the trajectory of human aging. *Nature Aging*. 2024 Apr;4(4):453-63.

Sena, C. M., Pereira, A. M., and Seíça, R. (2013). Endothelial dysfunction—a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1832, 2216–2231.

Seyedebrahimi R, Razavi S, Varshosaz J, Vatankhah E, Kazemi M. Beneficial effects of biodelivery of brain-derived neurotrophic factor and gold nanoparticles from functionalized electrospun PLGA scaffold for nerve tissue engineering. *Journal of Cluster Science*. 2021 May;32:631-42.

Silveira GB, Muller AP, Machado-de-Ávila RA, Silveira PCL. Advance in the use of gold nanoparticles in the treatment of neurodegenerative diseases: new perspectives. *Neural Regen Res*. 2021; 16(12):2425-2426.

Silveira PCL, Rodrigues MS, Gelain DP, de Oliveira J. Gold nanoparticles application to the treatment of brain dysfunctions related to metabolic diseases: evidence from experimental studies. *Metab Brain Dis*. 2023; 38(1):123-135.

Silveira PCL, Venâncio M, Souza PS, Victor EG, de Souza Notoya F, Paganini CS, Streck EL, da Silva L, Pinho RA, Paula MM. Iontophoresis with gold nanoparticles improves mitochondrial activity and oxidative stress markers of burn wounds. *Mater. Sci. Eng.* 2014;44:380–385.

Shareena G, Kumar D, Wu D. Traversing Through the Trajectory of Pathogenic Astrocytes in Alzheimer's Disease. *Deciphering Drug Targets for Alzheimer's Disease.* 2023 Sep 1:151-80.

Simpson, D. S., and Oliver, P. L. (2020). ROS generation in microglia: Understanding oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease. *Antioxidants* 9:743.

Sindler, A. L., Fleenor, B. S., Calvert, J. W., Marshall, K. D., Zigler, M. L., Lefer, D. J., et al. (2011). Nitrite supplementation reverses vascular endothelial dysfunction and large elastic artery stiffness with aging. *Aging Cell* 10, 429–437.

Spielman, L. J., Bahniwal, M., Little, J. P., Walker, D. G. & Klegeris, A. Insulin modulates in vitro secretion of cytokines and cytotoxins by human glial cells. *Curr. Alzheimer Res.* 12, 684–693 (2015).

Schwartz, M. W. et al. Evidence for entry of plasma insulin into cerebrospinal fluid through an intermediate compartment in dogs. Quantitative aspects and implications for transport. *J. Clin. Invest.* 88, 1272–1281 (1991).

Stoeckel, L. E. et al. Complex mechanisms linking neurocognitive dysfunction to insulin resistance and other metabolic dysfunction. *F1000Res.* 5, 353 (2016).

Sweeney, M. D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A. R., and Zlokovic, B. V. (2019). Blood-brain barrier: from physiology to disease and back. *Physiol. Rev.* 99, 21–78.

Tahami Monfared AA, Byrnes MJ, White LA, Zhang Q. Alzheimer's disease: epidemiology and clinical progression. *Neurology and therapy.* 2022 Jun;11(2):553-69.

Talbot, K. et al. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* 122, 1316–1338 (2012).

Thambisetty M, An Y, Tanaka T. Alzheimer's disease risk genes and the age-at-onset phenotype. *Neurobiology of aging.* 2013 Nov 1;34(11):2696-e1.

Thakur S, Dhapola R, Sarma P, Medhi B, Reddy DH. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current progress in molecular signaling and therapeutics. *Inflammation.* 2023 Feb;46(1):1-7.

Todd S, Barr S, Passmore AP. Cause of death in Alzheimer's disease: a cohort study. *QJM: an International Journal of Medicine.* 2013 Aug 1;106(8):747-53.

Uddin MS, Kabir MT, Al Mamun A, Barreto GE, Rashid M, Perveen A, Ashraf GM. Pharmacological approaches to mitigate neuroinflammation in Alzheimer's disease. *International Immunopharmacology.* 2020 Jul 1;84:106479.

Uemura, E. & Greenlee, H. W. Insulin regulates neuronal glucose uptake by promoting translocation of glucose transporter GLUT3. *Exp. Neurol.* 198, 48–53 (2006).

van der Heide, L. P., Ramakers, G. M. & Smidt, M. P. Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Prog. Neurobiol.* 79, 205–221 (2006).

Veronesi MC, Alhamami M, Miedema SB, Yun Y, Ruiz-Cardozo M, Vannier MW. Imaging of intranasal drug delivery to the brain. *American journal of nuclear medicine and molecular imaging.* 2020;10(1):1.

Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem.* 2000; 7(5):333-40.

Vives-Bauza C, Starkov A, Garcia-Arumi E. Measurements of the antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase. *Methods in cell biology*. 2007 Jan 1;80:379-93.

Walle LV, Opdenbosch NV, Jacques P, Fossoul A, Verheugen E, Vogel P, Beyaert R, Elewaut D, Kanneganti TV, Loo GV, Lamkanti M. Negative regulation of the NLRP3 inflammasome by A20 protects against arthritis. *Nature*. 2014;512:69-73.

Wallum, B. J. et al. Cerebrospinal fluid insulin levels increase during intravenous insulin infusions in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64, 190–194 (1987).

Wang Q, Chen S, Wang J, Shang H, Chen X. Advancements in Pharmacological Treatment of Alzheimer's Disease: The Advent of Disease-Modifying Therapies (DMTs). *Brain Sciences*. 2024 Sep 29;14(10):990.

Wardlaw, J. M., Doubal, F. N., Valdes-Hernandez, M., Wang, X., Chappell, F. M., Shuler, K., et al. (2013). Blood-brain barrier permeability and longterm clinical and imaging outcomes in cerebral small vessel disease. *Stroke* 44,525–527.

Werther, G. A. et al. Localization and characterization of insulin-like growth factor-i receptors in rat brain and pituitary gland using in vitro autoradiography and computerized densitometry* A distinct distribution from insulin receptors. *J. Neuroendocrinol.* 1, 369–377(1989).

Wortham, M. & Sander, M. Mechanisms of β -cell functional adaptation to changes in workload. *Diabetes Obes. Metab.* 18 (Suppl. 1), 78–86 (2016).

Xia, W. et al. Insulin resistance-associated interhemispheric functional connectivity alterations in T2DM: a resting-state fMRI study. *Biomed. Res. Int.* 2015, 719076 (2015).

Yamazaki Y, Zhao N, Caulfield TR, Liu CC, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nature Reviews Neurology*. 2019 Sep;15(9):501-18.

Yu Z, Luo F. The Role of Reactive Oxygen Species in Alzheimer's Disease: from Mechanism to Biomaterials Therapy. *Advanced Healthcare Materials*. 2024:2304373.

Zaccaron RP. Efeito de um peptídeo inibidor de IL-1 β associado à fotobiomodulação no reparo tecidual de feridas diabéticas. [Dissertação de Mestrado]. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2021.

Zhang J, Mou L, Jiang X. Surface chemistry of gold nanoparticles for health-related applications. *Chem Sci* 11: 923–936. 2020

Zhang J, Zhang Y, Wang J, Xia Y, Zhang J, Chen L. Recent advances in Alzheimer's disease: Mechanisms, clinical trials and new drug development strategies. *Signal transduction and targeted tZhangherapy*. 2024 Aug 23;9(1):211.

Zhao J, Liu X, Xia W, Zhang Y, Wang C. Targeting amyloidogenic processing of APP in Alzheimer's disease. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2020 Aug 4;13:137.

Zhao, W. et al. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J. Biol. Chem.* 274, 34893–34902 (1999).

Zortéa D, Silveira PC, Souza PS, Fidelis GS, Paganini CS, Pozzi BG, Tuon T, De Souza CT, Paula MM, Pinho RA. Effects of phonophoresis and gold nanoparticles in experimental model of muscle overuse: role of oxidative stress. *Ultrasound Med Biol*. 2015 Jan;41(1):151-62.

ANEXO A



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **06/05/2024**.

Título do projeto	Uso terapêutico de nanopartículas de ouro associadas à insulina em um modelo de demência tipo doença de Alzheimer
Project title	THERAPEUTIC USE OF GOLD NANOPARTICLES ASSOCIATED WITH INSULIN IN AN ALZHEIMER'S DISEASE TYPE DEMENTIA MODEL.
Número do protocolo Protocol number	88/2023
Pesquisador principal Principal Investigator	Paulo Cesar Lock Silveira
Pesquisadores Researchers	Fabio Pacheco Brandt, Laura de Roch Casagrande, Carolini Mendes, Gustavo de Bem Silveira, João Vitor Silvano Bittencourt, Germano Duarte Porto, Ligia Milanez Venturini, Maria Eduarda Anastácio Borges Corrêa, Rubya Pereira Zaccaron, Mateus Cardoso Colares, Igor Ramos Lima, Gabrielli Martins, Josiane Budni, Eduarda Behenck Medeiros, Adrielly Vargas, Laura Ceolin de Jesus, Amanda Boaventura, Paula Abatti Moretto, Maria Laura Cecconi dos Santos, Robert Cargnin Gonçalves, Gabriel Caetano da Silva, Ana Paula Benedet de Carvalho, Gabriela Piovesan Fenilli, Helder Robson de Oliveira Chaves Junior, Jaqueline Cardozo, Murilo Saibert Tenfen, Luísa Rosler Grings, Anny Caroliny Corrêa Bonfante, Kamila Caroline Rocha Ferreira, Vinícius Rampineli Alberton, Lidia Kulckamp Alberton, Ângela de Meira Saraiva Nunes, Pedro Mendes Maciel, Gabriel Casagrande Zobot, Maitê Matté, Camila da Costa, Lucas de Oliveira Pacagnan, Alice Machado Clemencia, Natanael Junior Lopes Specht, Vitória Oliveira Silva da Silva, Vitória Oliveira Silva da Silva, Lucas de Oliveira Pacagnan, Laura Baggio Moraes, Brenda Rodrigues Sousa, Julia Galvan Ghizzo, Maria Luiza Claudino Lisboa, Gielen Gabriela Reis Zancan, Larissa Rocha Fenalli, Norton da Rosa Haizenreder, Maria Laura Zanette Napolini, Pietra Prezemolski Maschio, Vithória da Silva Barni
Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	31/11/2023 a 30/10/2024
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico/ Black C57
Idade/Peso	90 dias/30 a 45g
Número de animais	Masculino 70
Procedência	Biotério Unesc

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Josiane Budni
Josiane Budni

Coordenadora da CEUA

Criciúma-SC, 06 de maio de 2024