



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Natalia dos Santos Tramontin

**Efeito do tratamento com ultrassom pulsado de baixa intensidade transcraniano sobre
parâmetros cerebrais em um modelo de doença de Alzheimer induzida por beta
amiloide**

Florianópolis

2022

Natalia dos Santos Tramontin

Efeito do tratamento com ultrassom pulsado de baixa intensidade transcraniano sobre parâmetros cerebrais em um modelo de doença de Alzheimer induzida por beta amiloide

Dissertação submetida ao Programa de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Pastoris Muller

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Tramontin, Natalia dos Santos

Efeito do tratamento com ultrassom pulsado de baixa intensidade transcraniano sobre parâmetros cerebrais em um modelo de doença de Alzheimer induzida por beta amiloide / Natalia dos Santos Tramontin ; orientador, Alexandre Pastoris Muller, 2022.

72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Neuroinflamação. 3. Estresse oxidativo. 4. Neurotrofinas. 5. Memória. I. Muller, Alexandre Pastoris. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Natalia dos Santos Tramontin

Efeito do tratamento com ultrassom pulsado de baixa intensidade transcraniano sobre parâmetros cerebrais em um modelo de doença de Alzheimer induzida por beta amiloide

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Rui Daniel Schroder Prediger, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos,
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Flávia Karine Rigo, Dr.(a)
Universidade do Extremo Sul Catarinense

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Alexandre Pastoris Muller
Orientador(a)

Florianópolis, 2022.

Dedico este trabalho a todos que contribuíram, de qualquer forma, para que este trabalho fosse finalizado, a cada um de vocês o meu muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço ao Papai do Céu, por ter me guiado e me ajudado a tomar decisões, além de ter me dado forças para passar pelos problemas de saúde, que por vezes atrapalharam o meu desempenho no mestrado.

Eu poderia aqui começar agradecendo os meus pais ou pessoas que eu mais amo neste mundo, mas sem dúvida nenhuma, a primeira pessoa que eu devo agradecer é o meu querido orientador e mentor, Professor Alexandre Pastoris Muller. Com toda a certeza sou muito grata por não ter desistido de mim, em meio a medos e inseguranças você me cobrava e me estimulava a continuar, mesmo eu não respondendo mensagens e e-mails, obrigada pela preocupação e pela dedicação. Professor, desde a primeira aula que tive com o senhor eu soube que queria receber a tua orientação para minha caminhada científica. Muito, muito, muito obrigada, eu poderia escrever muito mais, mas faltam-me palavras para dizer quanto de carinho e admiração que sinto por você, *meu pai na ciência!*

Agradeço a minha mãe Marcia e meu padrasto Giovane, o qual também chamo de pai, que me estimularam a continuar, sempre me apoiando, mesmo não entendendo, por vezes, o que é um mestrado, obrigada, eu amo vocês.

Agradeço também ao meu pai biológico Giovanni (sim, os dois tem quase o mesmo nome), que na sua simplicidade foi a pessoa que mais me incentivou, e soube que sempre foi muito importante para mim a caminhada que tive na minha vida acadêmica e científica.

Aos meus avós, que também, na sua simplicidade, sabiam o quanto me dediquei em todo meu período de graduação e momentos deste mestrado.

Agradeço ao meu *namorado*, João Felipe, que apareceu quando tudo isso já estava acontecendo, pandemia e mestrado. Sem dúvida, desde a sua chegada a minha vida ficou melhor, aprendi e continuo aprendendo todos os dias contigo. Obrigada por cuidar de mim com tanto amor e paciência, e principalmente, por ter me dado forças para continuar dizendo: “*Vamos amor, termina logo, falta pouco, nem que seja na força do ódio!*”, e assim aconteceu. Obrigada, meu amor, eu amo a nossa família, eu, tu e o nosso cachorro *bundãozinho* Pipe.

Agradeço aos meus irmãos, meus tios, primos e toda a minha família!

Agradeço aos meus amigos, aqueles que contribuíram de alguma forma para que esse projeto tenha sido executado, por se dedicarem e dar o seu melhor, disponibilizando seu tempo e sua energia, enfim, obrigada por nossa amizade e parceria.

Obrigada professores, por sua dedicação nesse momento tão difícil, mesmo com uma pandemia acontecendo nos ensinaram de forma brilhante, vou levar um pedacinho de cada um de vocês em minha carreira acadêmica.

Agradeço às duas universidades, a Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade de fazer o mestrado e a Universidade do Extremo Sul Catarinense que contribuiu para que essa dissertação fosse escrita, por ter realizado meu experimento em suas dependências.

Se eu fosse elencar cada pessoa que contribuiu para que este trabalho fosse finalizado teria que escrever muitas e muitas páginas, por isso, resumidamente, agradeço aos demais amigos, parceiros e colegas, o meu muito obrigada, essa dissertação tem um pedacinho de cada um de vocês!

“Não sei, só sei que foi assim!”
(*O alto da Compadecida* - Ariano Suassuna, 1955)

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que mais acomete indivíduos em idade avançada. Sendo caracterizada por piora cognitiva, bem como perda da memória e dificuldade de realizar as atividades cotidianas. De maneira fisiopatológica, seu principal achado molecular é deposição placas beta-amiloides (βA), seguida da hiperfosforilação de Tau, neuroinflamação e estresse oxidativo. Esses mecanismos causam danos cerebrais, como apoptose neuronal, e, conseqüente, redução da massa cerebral, observada em cérebro de pacientes *post mortem*. A DA não possui cura, apenas tratamento sintomático. A terapia com ultrassom pulsado de baixa intensidade (UPBI) já se mostrou eficiente contra modelos animais de DA, em aspectos comportamentais e moleculares, de forma indolor e não invasiva. Tendo em vista tais aspectos, nosso objetivo foi estudar como o a terapia com o UPBI em modelo animal de DA induzida por βA . O estudo foi realizado a partir de ratos machos, com 8 semanas de idade, mantidos em condições ambientais padrão, com comida e água a vontade, em ciclo claro/escuro de 12h. Os ratos foram submetidos a injeção intracerebroventricular de oligômero βA_{1-42} (400pmol). Após 24h, eles passaram a receber terapia com UPBI transcraniano, numa periodicidade de 48 horas, no mesmo horário, com duração de 5 minutos por animal, durante 5 semanas. Após o período de 5 semanas, os animais foram submetidos a testes comportamentais e, ao final dos testes, eutanasiados e extraídos hipocampo e córtex para análises bioquímicas. Os resultados apontam que o βA_{1-42} induziu prejuízo na memória de reconhecimento o que foi revertido pelo tratamento com UPBI. Os níveis de BDNF e NGF estiveram reduzidos significativamente no córtex no grupo βA_{1-42} , em comparação aos outros dois grupos. Enquanto isso, no hipocampo houve aumento do BDNF e NGF no grupo $\beta A_{1-42} + UPBI$, em comparação aos grupos sham e βA_{1-42} . Foram avaliados os níveis de IL-1 β , IFN- γ e IL-10, onde apenas no hipocampo a IL-10 se mostrou aumentada no grupo que recebeu a terapia com UPBI, em comparação aos outros grupos. Ao avaliar as espécies reativas a partir do DCFH, não foi possível observar diferenças significativas. Os níveis de nitrito no córtex estiveram aumentados no grupo $\beta A_{1-42}+UPBI$, comparados ao grupo sham, e em hipocampo também se apresentaram aumentados em relação ao grupo βA_{1-42} . Houve diminuição significativa de carbonilação de proteínas em hipocampo no grupo $\beta A_{1-42}+UPBI$, já no córtex não se observou diferença significativa. Ao avaliar enzimas antioxidantes, SOD e GSH, foi possível observar diferença significativa apenas em córtex, aumento dessa enzima no grupo sham, em comparação aos demais grupos. Nossos resultados indicam que a terapia com UPBI pode ser eficiente para melhora cognitiva e de níveis tróficos, visto que estes podem estar interligados. Sugerimos que mecanismos inflamatórios e oxidativos possam ter acontecido em outro momento, o qual não foi possível analisar. Em conclusão, nosso estudo serviu para guiar novos experimentos utilizando terapia de UPBI sobre modelos de DA por βA_{1-42} .

Palavras-chave: Neuroinflamação. Estresse oxidativo. Neurotrofinas. Memória.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (DA) is the neurodegenerative pathology that most affects individuals in old age. It is characterized by cognitive worsening, as well as memory loss and difficulty in performing daily activities. In a pathophysiological way, its main molecular finding is beta-amyloid plaque deposition (β A), followed by Tau hyperphosphorylation, neuroinflammation and oxidative stress. These mechanisms cause brain damage, such as neuronal apoptosis, and consequently, reduction of brain mass, observed in the brain of *postmortem patients*. AD has no cure, only symptomatic treatment. Low intensity pulsed ultrasound (UPBI) therapy has already been shown to be efficient against animal models of AD, in behavioral and molecular aspects, painlessly and noninvasively. In view of these aspects, our objective was to study how therapy with UPBI in an animal model of β A-induced AD. The study was conducted from 8-week-old male rats, kept in standard environmental conditions, with food and water at will, in a light/dark cycle of 12 h. The rats were submitted to intracerebroventricular injection of β A₁₋₄₂ oligomer (400pmol). After 24 hours, they began to receive therapy with transcranial UPBI, at a frequency of 48 hours, at the same time, lasting 5 minutes per animal, for 5 weeks. After the period of 5 weeks, the animals were submitted to behavioral tests and, at the end of the tests, euthanized and extracted hippocampus and cortex for biochemical analysis. The results indicate that β A₁₋₄₂ induced impairment in recognition memory, which was reversed by treatment with UPBI. BDNF and NGF levels were significantly reduced in the cortex in group β A₁₋₄₂ compared to the other two groups. Meanwhile, in the hippocampus there was an increase in BDNF and NGF in the β A₁₋₄₂ + UPBI group, compared to the control and β A₁₋₄₂ groups. IL-1 β , IFN- γ and IL-10 levels were evaluated, where il-10 was increased only in the hippocampus, which was increased in the group that received UPBI therapy compared to the other groups. When evaluating the reactive species from the DCFH, it was not possible to observe significant differences. Nitrite levels in the cortex were increased in the β A₁₋₄₂+UPBI group, compared to the control group, and in the hippocampus were also increased in relation to the β A_{group 1-42}. There was a significant decrease in protein carbonylation in the hippocampus in the β A₁₋₄₂+UPBI group, while in the cortex there was no significant difference. When evaluating antioxidant enzymes, SOD and GSH, it was possible to observe significant difference only in cortex, increase of this enzyme in the control group, compared to the other groups. Our results indicate that UPBI therapy may be efficient for cognitive improvement and better trophic levels, since these may be interconnected.

Keywords: Neuroinflammation. Oxidative stress. Neurotrophins. Memory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxa de declínio da memória.....	18
Figura 2 –Avanço da taupatia, deposição de β A e morte neuronal, no decorrer do tempo.....	22
Figura 3 – Vias amiloidogênica e não-amiloidogênica.....	24
Figura 4 – Receptores e ligantes amiloides.....	26
Figura 5 – Da Ativação microglial à apoptose neuronal.....	29
Figura 6 – Desenho experimental.....	37
Figura 7 – Tarefa de reconhecimento de objeto.....	41
Figura 8 – Níveis de neurotrofinas no córtex e hipocampo.....	42
Figura 9 – Neuroinflamação.....	43
Figura 10 – Marcadores de EROs E ERNs.....	44
Figura 11 – Marcadores de dano proteico.....	45
Figura 12 – Enzimas antioxidantes.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mec. de ação e status de ensaios clínicos de alguns medicamentos anti-DA.....20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT 1A	Receptor de serotonina 1A
7-nAChR	Receptor nicotínico alfa-7
AChE	Acetilcolinesterase
AICD	Domínio intracelular precursor de proteína amiloide
AIE	Área de Irradiação Eficaz
ANOVA	Análise de variância
APH-1	Faringe anterior 1 defeituosa
ApoE	Apolipoproteína E
apoJ	Apolipoproteína J
APP	Proteína precursora amiloide
ATP	Adenosina trifosfato
BACE	Beta secretase
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE	Barreira hematoencefálica
BNR	Relação de Não-deformidade do Feixe
CD36	<i>Cluster</i> de diferenciação
CEUA	Comitê de Ética local de Uso de Animais
Cm ³	Centímetros cúbicos
CTE	Cadeia de transporte de elétrons
DA	Doença de Alzheimer
DAMPS	Padrões moleculares associados a danos
DCF	2,7-diclorofluoresceína
DCFH	2,7-diclorodihidrofluoresceína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	2'-Desoxiadenosina 5'-trifosfato
DP	Desvio padrão
DTNB	Ácido 2-nitrobenzóico 5,5'-Dithiobis
ECE	Enzimas de conversão de endotelina
EphR	Receptor de linha celular de hepatoma produtor de eritropoetina

ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblasto 2
g	Grama
GDNF	Fator neurotrófico derivado de linha de células gliais
GSH	Glutathiona
HCl	Ácido clorídrico
ICV	Intracerebroventricular
IDE	Enzima degradante de insulina
IFN γ	Interferon γ
IGF-1	Fator de crescimento tipo insulina 1
IgG1	Imunoglobulina G1
IL 1 β	Interleucina 1 beta
IL-10	Interleucina 10
IL-18	Interleucina 18
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
JAK/STAT	Janus quinase proteína transdutora de sinal / ativador de transcrição
KCl	Cloreto de potássio
kg	Kilo
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LPS	Lipopolissacarídeo
LRP	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
M	Molar
mAB	Beta amiloide mensageiro
MAO	Monoamino oxidase
MAO-B	Monoamino oxidase B
MAPK	Proteína quinase ativadas por mitógeno
mg	Miligrama
mGluR5	Receptores metabotrópicos de glutamato
MHz	Mega Hertz

mm	Milímetro
ms	Milissegundo
Nct	Nicastrina
Nep	Neprilisina
NFκB	Fator nuclear kappa B NFκB
NGF	Fator de crescimento neuronal
NGF-β	Fator de crescimento nervoso beta
nm	Nanômetro
NMDA	Receptor N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptor de ácido N-metil-D-aspártico
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂ -	Íon superóxido
P75NRT	Receptor de neurotrofina p 75
PET FDG	Tomografia por emissão de prótons com desoxiglicose marcada com fluoro-18
pg	Picograma
PirB	Receptor B do tipo imunoglobulina pareada
proNGF	Proteína precursora NGF
PrPc	Receptor de proteína priônica celular
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
PS	Presenilinas
PSEN1	Potencializador de Presinilina 1
PSEN2	Potencializador de Presinilina 2
RAGE	Produtos finais de glicação avançada
RM	Ressonância magnética
s	Segundo
sAPPα / sAPPβ	Precursor solúvel de peptídeo amiloide alfa/beta
SARS-CoV-2 / COVID 19	Coronavírus
SCARA	Receptores <i>scavenger</i> B1
SEM	Erro padrão da média

SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TAU	Proteína que compõe os microtúbulos neuronais
TC	Tomografia computadorizada
TF	Tempo gasto explorando o objeto familiar
TLR	Receptores tipo <i>Toll-Like</i>
TN	Tempo gasto explorando o novo objeto
TNF α	Fator de necrose tumoral α
TrkA	Tropomiosina quinase A
UPAI	Ultrassom focado de alta intensidade
UPBI	Ultrassom focado de baixa intensidade
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
W	Watt
α	Alfa
α 7NACHR	Subunidade α do receptor nicotínico de acetilcolina
α -C83	Fragmento α -C-terminal de 83 aminoácidos
β	Beta
β A	Beta Amiloide
β -AR	Receptor β -adrenérgico
γ	Gama
μ L	Microlitro
μ Mol	Micromol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	DOENÇA DE ALZHEIMER.....	16
1.1.1	Diagnóstico.....	17
1.2	ASPECTOS NEUROCELULARES.....	18
1.2.1	Peptídeo βA_{1-42}.....	19
1.2.2	Células da glia e Fatores neurotróficos.....	22
1.2.3	Neuroinflamação.....	23
1.2.4	Estresse oxidativo.....	25
1.3	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO.....	28
1.4	ULTRASSOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE.....	31
1.5	OBJETIVOS.....	34
1.5.1	Objetivo Geral.....	34
1.5.2	Objetivos Específicos.....	34
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
2.1	ANIMAIS.....	15
2.2	CIRURGIA.....	15
2.3	TERAPIA UPBI.....	16
2.4	RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	16
2.5	EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS.....	17
2.6	LINHA DO TEMPO EXPERIMENTAL.....	17
2.7	ELISA.....	18
2.8	PARÂMETROS OXIDATIVOS.....	18
2.9	QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO.....	19
2.10	DETERMINAÇÃO DO DCFH.....	19
2.11	MEDIÇÃO DE DANO OXIDATIVO.....	19

2.12	ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	20
2.13	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO.....	20
2.14	ESTATÍSTICA.....	20
3	RESULTADOS.....	21
3.1	MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO.....	21
3.2	FATORES NEUROTRÓFICOS.....	22
3.3	NEUROINFLAMAÇÃO.....	23
3.4	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO.....	24
3.5	DANO PROTEICO.....	25
3.6	ESTADO ANTIOXIDANTE.....	26
4	DISCUSSÃO.....	28
5	CONCLUSÃO.....	35
	REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

A expectativa de vida está aumentando em todo o mundo, e segundo a Organização Mundial da Saúde, houve acréscimo na esperança de vida em mais de 6 anos, entre os anos de 2000 e 2019, aumentado de 66,8 anos para 73,4 anos, respectivamente. Isso ocorreu em decorrência da diminuição de mortalidade, aumentando também a expectativa de vida saudável de 8%, 58,3 anos em 2000 para 63,7 anos em 2019 (WHO, 2020).

Tendo em vista esse aumento de expectativa de vida, aumentaram também os índices de doenças que mais acometem idosos, dentre elas a demência. Esta doença apresenta natureza crônica e progressiva, resultando em deterioração de neurônios e, conseqüentemente, da função cognitiva, o que afeta a memória, o pensamento, a orientação, a capacidade de realizar cálculos, a aprendizagem e a linguagem, bem como mudanças de humor e descontrole emocional. Assim, a demência é uma das principais causas de incapacidade e dependência entre idosos, gerando impactos físicos, psicológicos, sociais e econômicos, envolvendo familiares ou cuidadores (KOVACS, 2018; WHO, 2021).

O diagnóstico da demência, muitas vezes pode ocorrer de forma tardia, devido estigmatização, o que demonstra a falta de conscientização das pessoas ao seu redor em relação a tal doença, além de barreiras ao diagnóstico e tratamento. Estima-se que cerca de 55 milhões no mundo possuem o diagnóstico demencial e espera-se que esse número aumente para 78 milhões em 2030 e 139 milhões em 2050 (WHO, 2021).

Ademais, a demência também pode ser um fator de risco para outras doenças. Um exemplo disso ocorreu recentemente, sendo tal doença considerada um fator de risco de mortalidade entre pacientes que contraíram o SARS-CoV-2/COVID 19, chegando a 62,2% de mortalidade entre os pacientes afetados pela demência, índice muito maior em comparação a pacientes sem demência (26,2%) (BIANCHETTI et al., 2020). Foi sugerido que esse resultado se deve à apresentação clínica de COVID -19, considerada atípica, reduzindo o reconhecimento precoce dos sintomas e a necessidade de internação, devido ao *delirium* hipoativo e piora do estado funcional desses pacientes com demência (BIANCHETTI et al., 2020).

As doenças neurodegenerativas que geram demência classificam-se basicamente por sintomas clínicos determinados pela região anatômica cerebral mostrando disfunção neuronal e por proteínas que mostram várias modificações bioquímicas, com acúmulo intra ou extracelularmente (KOVACS; BOTOND; BUDKA, 2010). Na Doença de Alzheimer (DA) os

principais achados são hiperfosforilação da proteína Tau intracelular, placas beta-amiloides (β A) extracelular, metabolismo celular reduzido, ativação de microglia, gerando neuroinflamação e estresse oxidativo/nitrosativo, o que resulta em morte neuronal (CHAE et al., 2004; JANSEN et al., 2015).

1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

Na demência atribuída à DA, os sintomas clínicos por vezes não são diagnosticados e são atribuídos incorretamente ou rejeitados e ignorados, o que causa atrasos prejudiciais no recebimento de cuidados adequados (ATRI, 2019). Tais sintomas envolvem distúrbios afetivos, déficit de atenção, dificuldade de aprendizado ou em lembrar de novas informações, desorientação geográfica, fluência verbal reduzida, entre outros, todos atrelados ao declínio cognitivo (ERATNE et al., 2018).

A DA é a alteração neurológica mais comum em idosos acima de 65 anos de idade, e afeta milhões de indivíduos em todo o mundo, sem distinção de raça, cor ou classe social, causando neurodegeneração e, conseqüentemente, a demência (CHEN et al., 2017). O primeiro caso de DA foi relatado por Alois Alzheimer, um psiquiatra e patologista alemão, de onde surgiu o nome da doença (BERCHTOLD; COTMAN, 1998). Alguns fatores de risco para o desenvolvimento da DA são idade, sexo (com maior prevalência no feminino), traumatismo cranioencefálico, histórico familiar/genética, obesidade, hipertensão, diabetes, dislipidemias, depressão e pouca atividade física (ATRI, 2019; GOLDSMITH, 2011).

Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na DA são complexos e multifatoriais. Sabe-se que há relação com duas proteínas, consideradas marcadores da doença. São elas as proteínas hiperfosforiladas TAU e o β A (YU; WU, 2021). A primeira está presente no meio intracelular ligada aos microtúbulos, estruturas responsáveis por sustentar o citoesqueleto do neurônio. Quando essa proteína é hiperfosforilada, ela pode desestabilizar os microtúbulos, se acumulando em forma de emaranhados neurofibrilares intracelulares que, por sua vez, são capazes de danificar a estrutura do neurônio, levando a apoptose (ZHANG et al., 2021).

A proteína β A é o principal marcador da doença, e é a partir dela que pode-se diagnosticar a DA (CHEN et al., 2017). O β A se forma no meio extracelular, a partir do mau processamento da proteína precursora amiloide (APP), que é liberada e acumula-se formando peptídeos e placas β A, que recrutam células da glia e iniciam a cascata de sinalização

inflamatória, podendo gerar danos neuronais e até apoptose celular (CARRILLO-MORA; LUNA; COLÍN-BARENQUE, 2014). Além disso, outros fatores fisiopatológicos estão envolvidos, como a neuroinflamação e estresse oxidativo, que podem resultar da hiperfosforilação da TAU e formação da β A (ZHANG et al., 2021).

1.1.1 Diagnóstico

O diagnóstico precoce da DA consistiria em uma grande vantagem para estabelecer o tratamento precoce, a fim de retardar a progressão da doença, porém, a identificação definitiva dá-se na avaliação *post-mortem* do tecido cerebral. No entanto, há evidências de que alguns biomarcadores da doença, encontrados no líquido cefalorraquidiano (LCR), associados a exames de imagem e diversos novos critérios clínicos, possam auxiliar no diagnóstico de indivíduos ainda em vida (WELLER; BUDSON, 2018).

Os primeiros sinais da doença envolvem déficit cognitivo, tornando-se ponto de partida para o diagnóstico, onde a avaliação básica médica é essencial para identificar sinais de demência, momento em que é necessário o encaminhamento para o especialista da área, a fim de dar continuidade na investigação da doença (KNAPSKOG et al., 2021). O segundo passo, após a avaliação clínica, é identificar alguns biomarcadores, e diversas alterações patológicas que podem surgir entre 10 a 20 anos antes do início dos sintomas mais comuns ou ainda em assintomáticos, os quais poderão ser quantificados laboratorialmente (JACK et al., 2018).

O início da doença é marcado pela formação e deposição de placas amiloides insolúveis extracelularmente, fosforilação de proteínas TAU no meio intracelular, seguidas de dano neuronal, ativando o sistema imunológico e danificando sinapses, diminuindo a produção de neurotransmissores (LUKIW et al., 2020). Os biomarcadores podem ser identificados e quantificados no LCR, onde é possível medir os níveis de amiloide solúvel fosforilada e total, mas seus níveis no LCR são inversamente proporcionais entre placas amiloides e amiloides solúveis (JANSEN et al., 2015). Amiloide total é um marcador inespecífico para DA e indica dano neuronal e outras condições, enquanto a amiloide fosforilada é específica para DA (BLENNOW et al., 2015a). Apesar da possibilidade de identificação desses biomarcadores precocemente, não se deve excluir outros exames complementares para o diagnóstico final da doença.

Ademais, é possível identificar a DA por meio de alguns exames de imagem que evidenciam o nível de atrofia ou atividade do metabolismo, como ressonância magnética (RM) e tomografia computadorizada (TC) (SCHELTENS et al., 1992). A tomografia por emissão de prótons com desoxiglicose marcada com fluoro-18 (PET FDG) é capaz de medir o metabolismo, que nesta doença apresenta-se reduzido, enquanto por meio da tomografia por emissão de prótons é possível quantificar a deposição de amiloide (KNAPSKOG et al., 2021). Além disso, exames de genotipagem podem identificar genes que codificam apolipoproteína E (APOE) ou mutações das presinilinas PSEN1, PSEN2 e APP, mas essa análise se torna relevante apenas quando é identificado casos de demência familiar (SCHELTENS et al., 2016). A combinação desses métodos é crucial para diagnóstico correto, a fim de estabelecer a farmacoterapia correta para o indivíduo.

1.2 ASPECTOS NEUROCELULARES

Alguns achados neurocelulares caracterizam a fisiopatologia da DA, e devido à complexidade desses achados, alguns mecanismos exatos permanecem incertos (PEREIRA et al., 2019). De forma bem definida, pode-se citar a hiperfosforilação da proteína TAU, que formam emaranhados neurofibrilares intracelulares que prejudicam sistemas de transporte de neurotransmissores e outras moléculas, causando apoptose neuronal (ITTNER; GÖTZ, 2011).

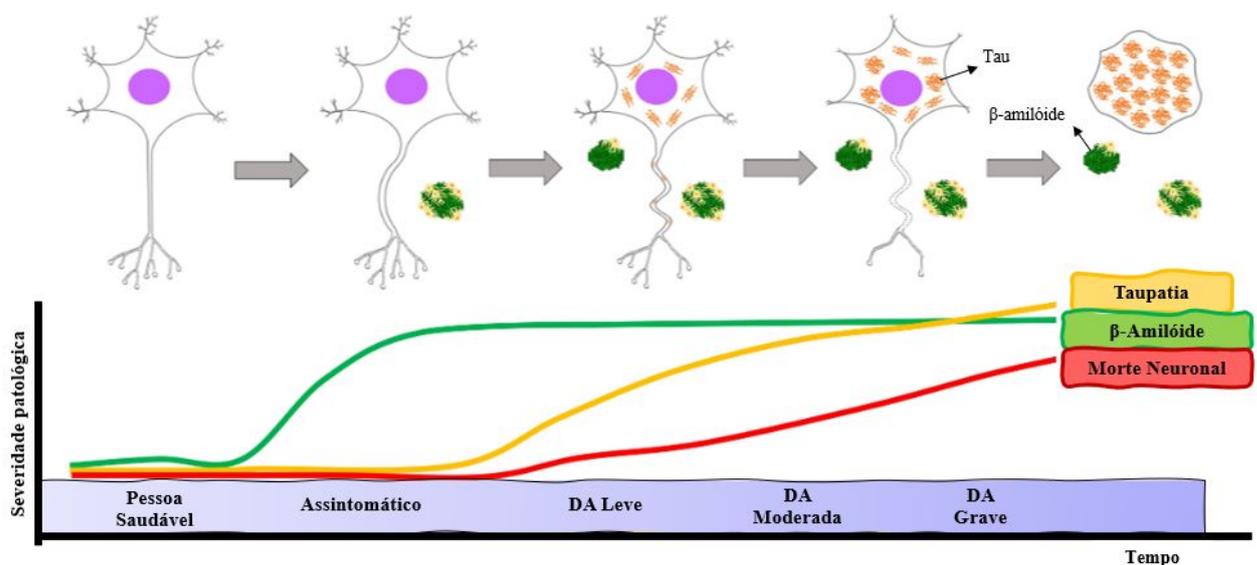


Figura 2. Avanço da Taupatia, deposição de β A e morte neuronal, no decorrer do tempo.

Os principais marcadores da DA são a deposição de β A e acúmulo de proteína Tau, onde o primeiro marcador citado é o que inicia todo o processo de doença, ainda na fase assintomática. O processo de morte neuronal e deposição da proteína Tau se inicia apenas na fase leve da doença, momento em que doença já pode ser diagnosticada. Quanto maior os níveis desses marcadores, maior é a severidade da doença.

Traduzida de García-Morales et al., 2021.

Na Figura 2, pode-se visualizar, de forma ilustrativa, a evolução da doença de acordo com a gravidade, a taupatia, a deposição de β A e a morte neuronal. Note que o β A é o primeiro sinal cerebral, e surge antes mesmo dos primeiros sinais e sintomas da doença, seguido de hiperfosforilação da Tau, apresentada apenas no estágio leve à moderado da doença (GARCÍA-MORALES et al., 2021). Tendo em vista que o β A é o primeiro a surgir e se mantém por todo tempo de doença até a morte, é importante que terapias preventivas ou reversíveis, capazes de diminuir a produção dessa molécula sejam de maior importância.

1.2.1 Peptídeo β A₁₋₄₂

O peptídeo β A é formado a partir de uma falha na fragmentação da APP por β e γ -secretase, que participam da fase final de processamento do APP (ATRI, 2019; CHIANG et al., 2020). O APP é uma proteína de membrana, e faz parte da família de proteínas membranares tipo 1, possuindo algumas funções fisiológicas como: sinalização neurotrófica, adesão e sinalização celular (NIXON, 2007). Após ser sintetizada, essa proteína é carregada para membrana, onde é processada por duas vias alternativas: a via amiloidogênica, que dará origem à fragmentos danosos ao cérebro, e a via não-amiloidogênica, que origina fragmentos facilmente depurados e não causam danos aos neurônios (JÄGER et al., 2009).

Na via não-amiloidogênica (Figura 3), a APP é clivada por uma α -secretase ligada à membrana, em seu terminal extracelular, liberando sAPP α , fragmento N-terminal, e outro fragmento α -C-terminal de 83 aminoácidos (α -C83). Este último fragmento é clivado novamente, por γ -secretases, o que gera uma porção P3 extracelular e domínio intracelular de APP (AICD) (CHEN et al., 2017). O complexo intermembranar de γ -secretases, também conhecido por BACE, é composto pelas proteínas presenilinas (PS), nicastrina (Nct), faringe anterior 1 defeituosa (APH-1) e potenciador de presenilina 2 (PEN-2) (ZHANG et al., 2014). Quanto maior a atividade elétrica e a ativação de receptores muscarínicos, maior será a

liberação de sAPP α , advindo de aumento da clivagem de APP pela α -secretase (CHEN et al., 2017; JÄGER et al., 2009; REIMAN, 2016).

A via amiloidogênica é caracterizada pela ação sequencial de β e γ -secretases, ligadas às membranas. Num primeiro momento, o domínio extracelular de APP é clivado pela β -secretase, gerando sAPP β , fragmento N-terminal, e outro C-terminal de 99 aminoácidos (C99) preso à membrana. Consecutivamente, esse último fragmento sofre a ação da γ -secretase, restando um (AICD), que pode translocar para o núcleo, que tem a capacidade de modificar a expressão gênica, induzindo genes apoptóticos, e é na clivagem extracelular de APP/C99 que surgem os fragmentos neurotóxicos β A (CHEN et al., 2017; NIXON, 2007).

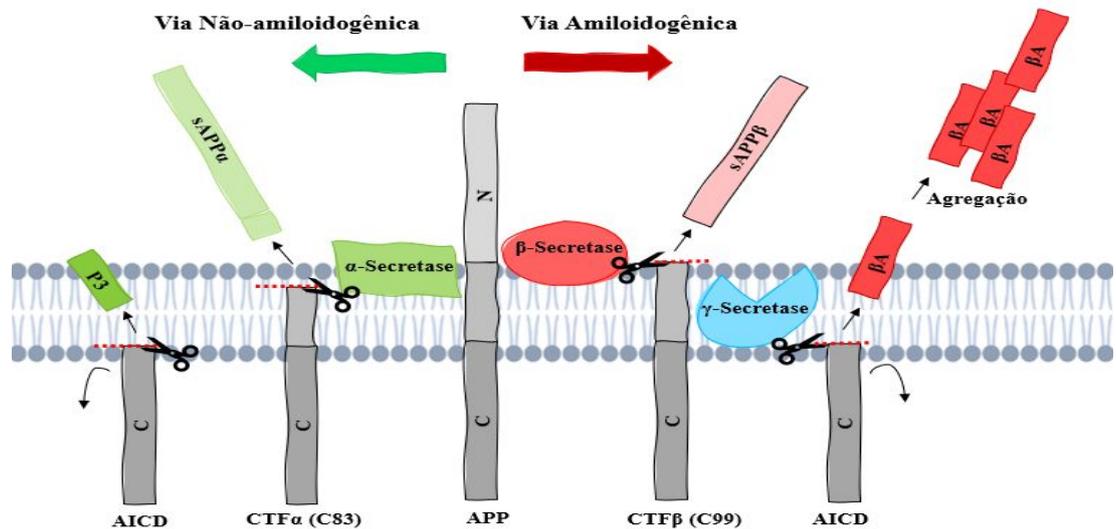


Figura 3. Vias amiloidogênica e não-amiloidogênica.

Na via não-amiloidogênica, a APP é processada por uma α -secretase, e segue-se para sua via fisiológica. Na via amiloidogênica, essa mesma proteína é clivada por uma β -secretase, progredido para formação de fragmentos β A neurotóxicos.

Fonte: Adaptado de Chen et al., 2017.

Dependendo onde é clivado o fragmento C99, é possível gerar frações contendo 43, 45, 46, 48, 49 e 51 aminoácidos, que posteriormente são finalmente fragmentados em β A de 40 aminoácidos e β A de 42 aminoácidos (β A₁₋₄₂) (OLSSON et al., 2014). Em um primeiro momento, os monômeros de β A são liberados e, em seguida, eles podem agregar-se em vários tipos de montagens, maiores e mais insolúveis, oligômeros, protofibrilas e fibrilas amiloides, que agregaram-se entre si formando placas, e se espalham por todo o cérebro, geralmente

encontradas no córtex (HAASS et al., 1992). Apesar das placas serem mais insolúveis, são os oligômeros que causam maior dano cerebral, pois eles se agregam em dímeros, trímeros, tetrameros e pentâmeros, são facilmente solúveis, promovem neurotoxicidade, falhas em sinapses, e, conseqüentemente, falhas na memória, principal característica da DA (KLEIN; KRAFFT; FINCH, 2001).

Em situações patológicas, os astrócitos podem contribuir para o agravamento da DA através de uma série de alterações morfológicas, que os transforma em astrócitos reativos, e por sua vez, liberam citocinas e fatores inflamatórios. Este processo gera neuroinflamação, além de aumentar espécies reativas de oxigênio, contribuindo pra o estresse oxidativo e aumento da β A cerebral (HENEKA; RODRÍGUEZ; VERKHRATSKY, 2010).

O β A possui algumas funções biológicas, desde monômeros à placas, interagem como potenciais receptores e ativam vias intracelulares, que podem causar repostas danosas ao neurônio e morte neuronal (CHEN et al., 2017). Entre esses receptores pode-se citar o receptor de neurotrofina p 75 (P75NRT), o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP), o receptor de proteína priônica celular (PrP^c), os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR5), subunidade α do receptor nicotínico de acetilcolina (α 7NACHR), o receptor de ácido N-metil-D-aspartico (NMDAR), o receptor β -adrenérgico (β -AR), o receptor de linha celular de hepatoma produtor de eritropoetina (EphR), o receptor B do tipo imunoglobulina pareada (PirB), os receptores *scavenger* B1 (SCARA) e o receptores de produtos finais de glicação avançada (RAGE), os receptores e seus respectivos ligantes são encontrados na Figura4 (CHEN et al., 2017; CHOI et al., 2014; COSTA et al., 2012; KIM et al., 2013; SHANKAR et al., 2007).

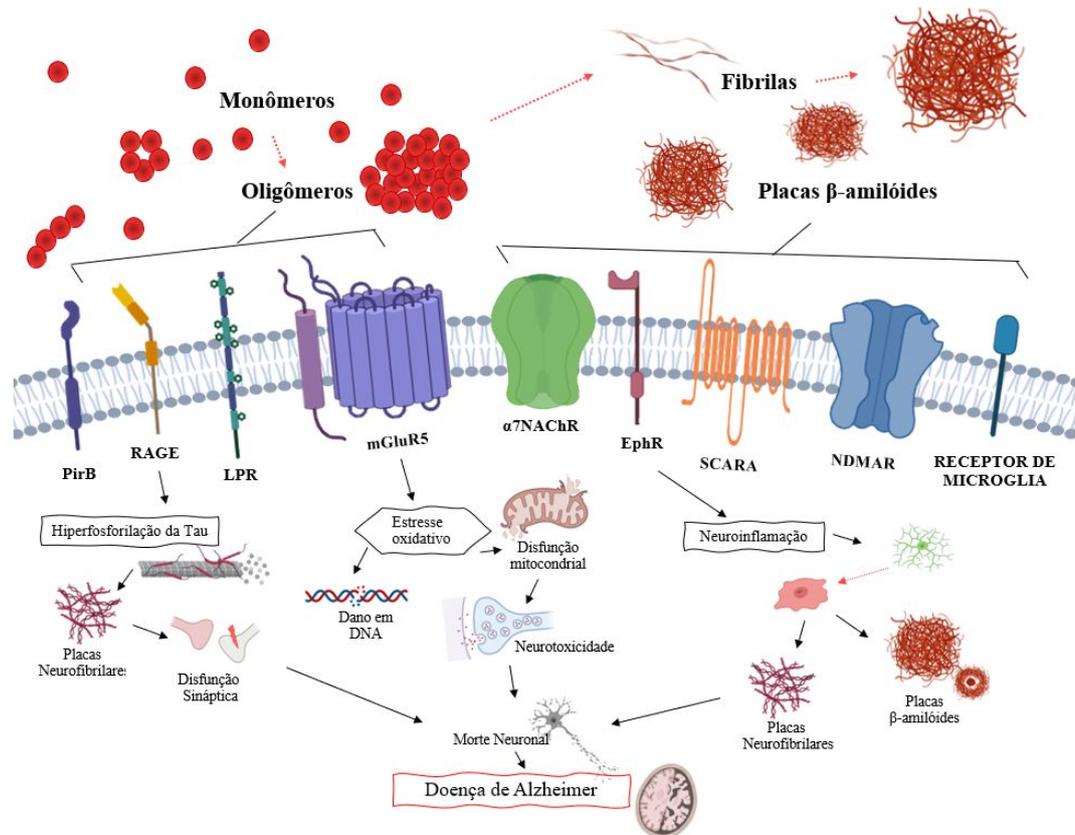


Figura 4. Receptores e ligantes amiloides.

Os monômeros, oligômeros, fibrilas e placas β A, ligam-se a receptores na membrana, os quais dão início a diversos outros mecanismos prejudiciais ao cérebro, como hiperfosforilação da TAU, formação de radicais livres, neuroinflamação, disfunção mitocondrial, dano em DNA, disfunção sináptica e morte neuronal.

Fonte: Adaptado de Chen et al., 2017.

Assim como quase toda substância presente no cérebro, a depuração e transporte de β A também acontece. O β A solúvel é capaz de ser transportado pela barreira hematoencefálica do plasma para o cérebro via RAGE e do cérebro para o plasma via LRP, podendo também se ligar a proteínas de transporte como apolipoproteínas E e J, e α 2-macroglobulina (α 2M) e ser degradado pelas proteases neprilisina (Nep), enzimas de conversão de endotelina (ECE), enzima degradante de insulina (IDE) e plasmina, bem como de degradação através da microglia (IWATA et al., 2000).

O comprometimento da memória e neuroinflamação é aumentado quando administrado intracerebroventricular oligômeros de β A₁₋₄₂, através da ativação microglial por

receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que identificam essa molécula como patógenos, estimulando a cascata inflamatória (KIGERL et al., 2014; MORRONI et al., 2016; YANG et al., 2017). Desta forma, esse modelo animal pode apresentar aumento da expressão e produção de citocinas pro-inflamatórias (XU et al., 2016, 2018). Em média, o tempo para indução da neuroinflamação, estresse oxidativo e déficit cognitivo é apresentado 3 à 8 semanas após a injeção de oligômeros de βA_{1-42} (AZM et al., 2018).

1.2.2 Células da glia e Fatores neurotróficos

Cerca de 5 a 10% do volume de células cerebrais é composto de microglia, que servem como células do sistema imune no SNC, também conhecidos como os macrófagos do cérebro (MARÍN-TEVA et al., 2012). Normalmente, a microglia assume sua forma ramificada o que contribui para manutenção da homeostase cerebral, interagindo com outras células vizinhas, dando apoio tanto por contato físico quanto por liberação de fatores solúveis, além de regular a neurogênese, e em sua forma ameboide é capaz de realizar a fagocitose em processos inflamatórios (ARAKI; IKEGAYA; KOYAMA, 2021).

Dentre os fatores solúveis que a microglia é capaz de secretar, pode-se citar alguns fatores tróficos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento tipo insulina 1 (IGF-1), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), além de fatores inflamatórios como o fator de necrose tumoral α , o interferon γ (IFN γ), a interleucina 1 β (IL 1 β), a interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 18 (IL-18) (YANG et al., 2010).

Os astrócitos são os principais secretores do cérebro, sendo capazes de captar e liberar vários fatores essenciais à saúde do neurônio, contribuindo para homeostase cerebral, ademais, auxiliam na transmissão sináptica, envolvendo as pré e pós-sinapses (ALLEN; BARRES, 2009). Essas células são as principais secretoras de fatores de crescimento como o BDNF, os fatores de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2) e o fator neurotrófico derivado de linha de células gliais (GDNF), além de interleucinas (ARAKI; IKEGAYA; KOYAMA, 2021).

O BDNF foi a primeira neurotrofina a ser associada com déficit cognitivo e demência. Além disso, essa proteína é capaz de aumentar impulsos nervosos e, em cultura celular, pode ser observada geração de potenciais de ação com maior frequência. Ademais, também é capaz de aumentar a atividade de sinapses glutamatérgicas, essenciais para

formação de novas memórias (ELMARIAH et al., 2004; PARK e POO, 2013; CHEN, LAN e YANG, 2019). Diversos autores foram capazes de apresentar resultados experimentais promissores na memória e aprendizado ao administrar BDNF em animais com deficiência cognitiva (MURER et al., 1999).

Outra neurotrofina envolvida na sobrevivência neuronal e função cognitiva é o fator de crescimento do nervo (NGF), a expressão de seus receptores está localizada principalmente em receptores colinérgicos, principais neurônios envolvidos na função cognitiva (SCHWAB et al., 1979). Após a liberação de NGF como proteína precursora (proNGF) pelos neurônios pós-sinápticos, essa proteína se liga ao receptor de receptores de tropomiosina quinase A (TrkA), e por meio de transporte retrógrado, inicia uma cascata de sinalização para liberação de acetilcolina (ZHENG; KOO, 2011).

Na DA já foi descrito que há alteração desta via, de forma negativa, como regulação negativa do receptor TrkA, a sinalização e o transporte retrógrados prejudicados, o aumento da degradação de NGF e a resposta inflamatória devido à redução da produção de Ach e, também, ao aumento dos níveis de β A (MITRA; BEHBAHANI; ERIKSDOTTER, 2019). Autores discutem que o aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem reduzir a expressão do receptor TrkA e prejudicar a via de sinalização NGF/TrkA, o que pode ocasionar déficits na memória e na aprendizagem (KROPF; FAHNESTOCK, 2021).

1.2.3 Neuroinflamação

A neuroinflamação é uma condição apresentada em várias doenças neurodegenerativas, dada a sua importância, estudos atuais, realizados em animais e humanos, já investigam as modificações causadas pela inflamação no cérebro a partir de imagens com PET *in vivo* (ZHOU et al., 2021). A inflamação cerebral é um evento patogênico chave da etiologia da DA, porém, ainda não foi possível validar clinicamente métodos de diagnóstico a partir dela, mas sabe-se que o acúmulo de β A pode estimular a microglia e todo processo inflamatório envolvido (PERRY; HOLMES, 2014). A microglia é a principal célula envolvida no processo de neuroinflamação, tanto de forma fisiológica, quanto de forma patológica ou crônica. Ao se ativar, ela assume a forma ameboide que é capaz de realizar fagocitose e de secretar fatores anti e pró-inflamatórios, que podem atuar como fator

neuroprotetor ou causar ainda mais danos ao cérebro, como apoptose neuronal (TAYLOR et al. 2013).

Já foi constatado por vários estudos que o β A pode ativar a produção de citocinas inflamatórias pela ativação microglial, através de PRRs o que pode ocasionar a morte neuronal (GARCEZ et al., 2017, 2019; YANG et al., 2017). Outros receptores são ativados pelo β A, sendo eles o SCARA 1, os marcadores de agrupamento de diferenciação de superfície celular (CD), a integrina α 6 β 1 e os receptores tipo Toll-Like (TLR): TLR2, TLR4, TLR6 e TREM2, e através destes, estimula a microglia a liberar citocinas pró-inflamatórias, que interferem na síntese de citocinas anti-inflamatórias (BAMBERGER et al., 2003).

A neuroinflamação ativa a via das caspases na microglia e induz a apoptose neuronal, outra característica dos modelos de AD. Ademais, a ativação microglial por APP também pode ocorrer através da via das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), que inicia a geração de marcadores pró-inflamatórios, bem como, também ser desencadeada por citocinas, principalmente: interleucina I beta (IL I β) (BODLES; BARGER, 2005). Outrossim, as vias Janus quinase/duas proteínas de transdutor de sinal e ativador de transcrição (JAK/STAT) e fator nuclear kappa B (NF κ B) também estão envolvidas, e autores mostram uma forte relação na ativação microglial envolvida na patogênese da DA (WAN et al., 2021).

Visto isso, pode-se dizer que os fatores inflamatórios estão ativamente presentes no cérebro do paciente com DA, dentre esses fatores podemos citar: a IL I β e o interferon gama (INF- γ), e outras citocinas, que em conjunto, podem levar ao quadro de neuroinflamação, induzir a produção excessiva de espécies reativas, causando lesão celular, o recrutamento de neutrófilos, e a ativação da neuroglia, o que forma um ciclo de inflamação crônica (BLOCK; ZECCA; HONG, 2007; IULITA et al., 2014).

Vários estudiosos encontraram em amostras *post mortem* de indivíduos com DA níveis aumentados de IL-I β , INF- γ e iNOS, bem como radicais livres, e em outros estudos foi possível encontrar em amostras de sangue e LCR de pacientes com DA expressões aumentadas dos mesmo marcadores inflamatórios, além de marcadores anti-inflamatórios como IL-10 (AKIYAMA et al., 2000; KHEMKA et al., 2014; SASTRE; KLOCKGETHER; HENEKA, 2006). Em resumo, o β A é capaz de ativar a microglia, que por sua vez secreta radicais livres e fatores pró e anti-inflamatórios, esses fatores podem advir através das vias de sinalização intracelular ou mesmo, ativar essas vias por si, através da ligação com receptores de membranas, além de serem produzidas pela simples ação do β A. As citocinas juntamente

com radicais livres causam danos ao neurônio, ativando vias apoptóticas, levando a morte neuronal e progressão da DA, como demonstrado na Figura 5.

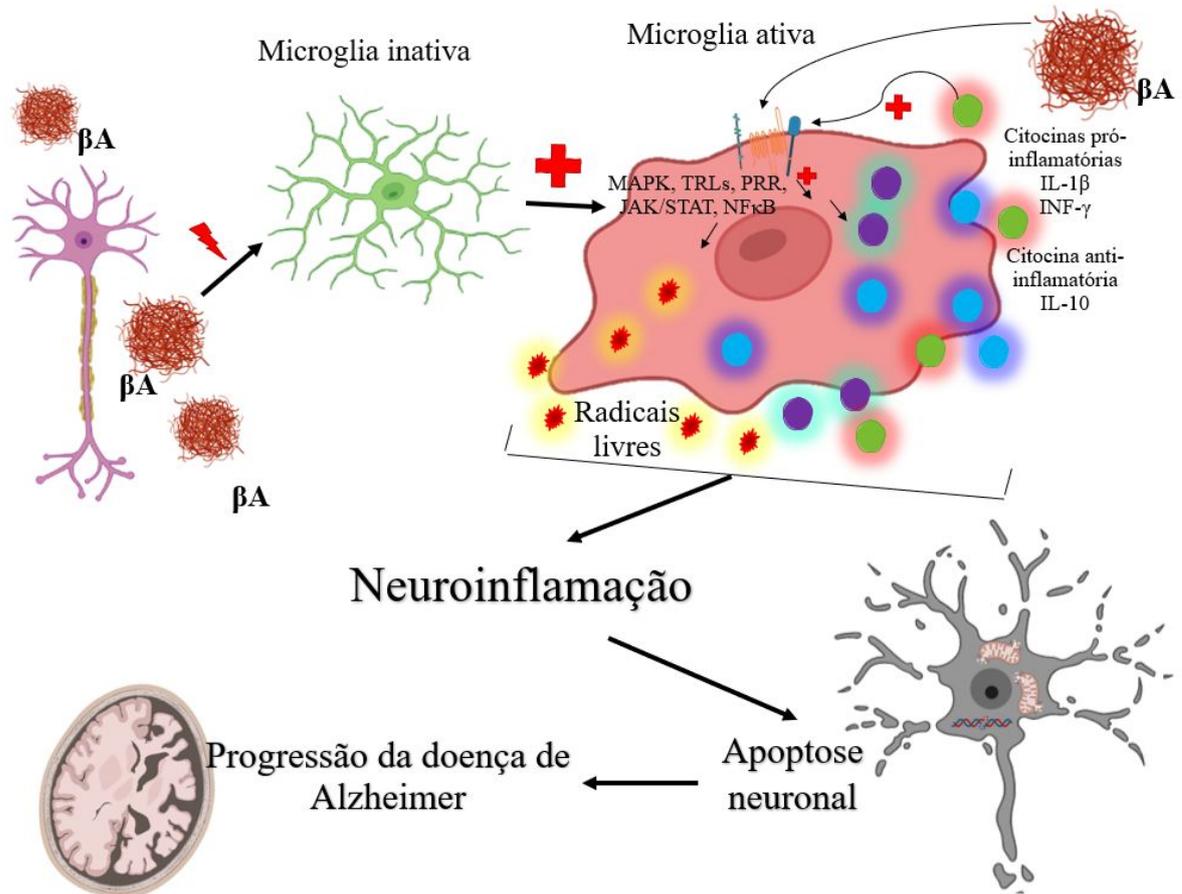


Figura 5. Da Ativação microglial à apoptose neuronal.

A neuroinflamação surge através da ativação microglial, que por sua vez, secreta fatores pró-inflamatórios e radicais livres, com o objetivo de destruir o βA .

Fonte: a autora.

1.2.4 Estresse oxidativo

Na DA o acúmulo de βA é capaz de promover a neurodegeneração através de vários mecanismos, incluindo a disfunção mitocondrial, que resulta em produção de radicais livres através do funcionamento anormal da cadeia de transporte de elétrons (CTE), devido a danos em seus complexos (REDDY; BEAL, 2005; SWERDLOW; BURNS; KHAN, 2014). Vários estudos em cérebros *post-mortem*, tanto em humanos com DA quanto em modelos animais de DA, demonstraram anormalidades mitocondriais, metabolismo energético reduzido, mitofagia

reduzida, processo de eliminação de mitocôndrias através de autofagia, aumento concomitante da secreção de citocinas pró-inflamatórias e inibição da depuração de β A (BLENNOW et al., 2015b; FANG et al., 2019; KIM; MOOK-JUNG, 2019; MINOSHIMA et al., 1997).

Em modelos animais de DA, foi possível observar, também, o declínio cognitivo o que demonstra forte ligação com os danos mitocondriais, e com liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPS), bem como a redução de ATP (AGRAWAL; JHA, 2020; EDLER; MHATRE-WINTERS; RICHARDSON, 2021). Evidências indicam que a injeção de β A cerebral é capaz de gerar comprometimento cognitivo, aumento de danos causados por radicais livres e declínio da atividade de enzimas antioxidantes, bem como, perda sináptica relaciona a DA (MARCUS et al., 1998; PADURARIU et al., 2010; RADI et al., 2014)

O aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) ou de nitrogênio (ERNs) no cérebro está fortemente associado a modelos de demência e/ou DA, podendo ser o gatilho para processos pró-inflamatórios, como a produção de citocinas e quimiocinas nocivas ao cérebro, ou mesmo ocasionando o contrário, induzindo o aumento dessas espécies reativas por meio da inflamação (ZUSSY et al., 2013; SHARMA et al., 2016). No cérebro, a microglia é a principal célula produtora de radicais livres, por ser também a que mais libera interleucinas pró-inflamatórias, reduzindo a defesa antioxidante (EDLER; MHATRE-WINTERS; RICHARDSON, 2021; KOELLHOFFER; MCCULLOUGH; RITZEL, 2017).

Os radicais livres são moléculas altamente reativas e instáveis que perderam um elétron na sua última camada de valência, desta forma, estão sempre capturando elétrons de outras moléculas normais (ARUOMA et al., 2007). O radical livre mais prejudicial é advindo do oxigênio, o íon superóxido (O_2^-) (SAUER; WARTENBERG; HESCHELER, 2001)

Espécies reativas de oxigênio (EROs), quando em níveis normais, são capazes de desempenhar funções benéficas de sinalização cerebral (MERAZ-RÍOS et al., 2014). Tais moléculas surgem do metabolismo mitocondrial, através da CTE; em macrófagos, com função de defesa a insultos; e peroxissomos (KURUTAS, 2016). Um desequilíbrio nos níveis de EROs, em concentrações altas, tornam estas moléculas capazes de modificar negativamente lipídeos celulares, membranas, expressão de proteínas e DNA, o que pode ocasionar a apoptose celular (BALENDRA; SINGH, 2021; KANSANEN; JYRKKÄNEN; LEVONEN, 2012).

O nitrito é uma espécie reativa de nitrogênio derivada do óxido nítrico (NO) que, em níveis normais, é capaz de estimular a proliferação celular (SHABAB et al., 2017). Essa

molécula tem como sua principal função sinalização e é sintetizada por três formas de óxido nítrico sintase (NOS): NOS endotelial, NOS neuronal e NOS induzível (iNOS) mas destas, apenas a última é ativada em condições patológicas na DA, ocorrendo principalmente na microglia (SHABAB et al., 2017).

A iNOS pode ser estimulada por algumas interleucinas, como em caso de neuroinflamação, por exemplo, e o aumento de NO leva à indução de nitração de várias proteínas cerebrais (UDDIN et al., 2020). A produção de radicais livres, no caso do nitrito, promove a desaminação de bases do DNA que contém grupo amina (-NH₂) livre, sendo elas a guanina e a citosina de adenina. Essa nitração pode causar apoptose neuronal, além contribuir para o aumento adicional de iNOS e NO, elevando ainda mais os radicais livres e provocando efeitos citotóxicos no cérebro (DHAPOLA et al., 2021).

À medida que as espécies reativas aumentam, mecanismos de eliminação dessas são iniciados (AOYAMA; NAKAKI, 2013). As enzimas antioxidantes são moléculas capazes de inativar os radicais livres, tornando-os moléculas inertes, que não causaram danos ao tecido (CHEN et al., 2022). A glutathione (GSh) é uma das moléculas de defesa antioxidante presentes no cérebro, exercendo seus efeitos através da doação de um equivalente redutor a uma espécie reativa de oxigênio para neutralizá-lo (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009). Em modelos animais de doenças neurodegenerativas e *in vitro* já foi possível observar que baixos níveis de GSH está relacionado com maior morte neuronal, demonstrando que a GSH pode ser um potencial alvo terapêutico dessas doenças (AOYAMA; NAKAKI, 2013; SAHARAN; MANDAL, 2014).

A superóxido dismutase (SOD) é a primeira linha de defesa contra o radical livre O₂⁻, e, visto a sua reatividade, faz-se dessa enzima a mais importante (SALMAN; ASHRAF, 2015). A SOD é uma metalenzima, que reage na presença de Fe²⁺, através da reação de Fenton, para formar o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e oxigênio (O₂) (SEIFRIED et al., 2007). Contudo, se a concentração de radicais livres superar a capacidade enzimática da SOD, o O₂⁻ pode combinar com NO e formar o peroxinitrito (ONOO⁻) ou formar radicais hidroxila (OH•), um oxidante mais forte e mais prejudicial que o O₂⁻ (IMLAY; LINN, 1988). Estudos demonstram que a diminuição da atividade da SOD está intimamente ligada ao estresse oxidativo apresentado na DA, indicando que formas de modular positivamente podem ser promissoras no que se refere à doenças neurodegenerativas (BALENDRA; SINGH, 2021).

A carbonilação proteica é resultado da ação direta de espécies reativas de oxigênio produzindo modificações oxidativas nas proteínas (BERLETT; STADTMAN, 1997). A introdução de grupos carbonil (C=O) nos resíduos de aminoácidos é uma marca registrada destas modificações oxidativas e sabe-se que quase todos os aminoácidos são susceptíveis a essa modificação causada pelas espécies reativas de oxigênio (ALMEIDA; DE OLIVEIRA RIBEIRO, 2014).

Diante disso, a reação destes grupos carbonil com reagentes específicos é uma forma eficiente de inferir se está ocorrendo dano oxidativo em proteínas (LEVINE et al., 1990). Esse grupamento surge através da degradação oxidativa de peróxidos lipídicos (LOOH) (VINCENTI et al., 2019). Uma vez sujeitas ao dano oxidativo, as proteínas precisam ser reparadas. No entanto, se isso não for possível, elas são degradadas e eliminadas das células para minimizar efeitos negativos potenciais destas moléculas (BISWAS; MANO, 2021).

1.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

Atualmente, não há tratamento para atenuar o declínio cognitivo progressivo, apenas o tratamento paliativo com objetivo de melhora na qualidade de vida dos pacientes. A seguir, a Figura 1 ilustra a taxa de declínio da memória ao longo do tempo em um indivíduo com DA. Em pessoas que não possuem a DA, a memória diminui lentamente devido ao envelhecimento. Já na DA há um declínio cognitivo mais acentuado que, por vezes, se inicia precocemente na vida, o que ocasiona o decaimento da memória. As terapias atuais tentam melhorar a memória, mas não obtêm sucesso contra o declínio na doença. Os resultados esperados de novos fármacos é que eles reduzam a taxa de declínio da doença (WELLER; BUDSON, 2018).

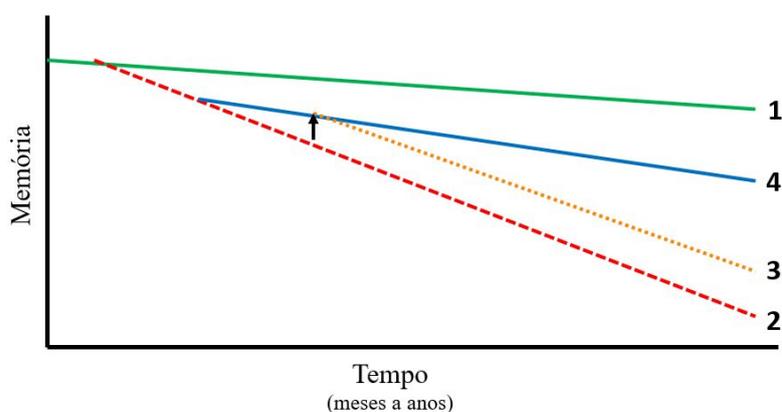


Figura 1. Taxa de declínio da memória 1- Estado normal/natural, 2- Declínio precoce de memória, paciente com DA, 3- DA com terapia atual e 4- resultado esperado de novos fármacos.

Fonte: Traduzido de Weller; Budson, 2018.

Nos dias de hoje, há duas classes principais de medicamentos utilizados na terapia da DA, são eles: i) os inibidores da acetilcolinesterase (donepezil, rivastigmina e galantamina) e, ii) os antagonistas não competitivos do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (a memantina) (WELLER; BUDSON, 2018). Alguns outros fármacos estão sendo desenvolvidos e explorados quanto à capacidade de diminuir o prejuízo ao cérebro em indivíduos com DA, dentre esses, pode-se observar as drogas multialvos, moléculas híbridas compostas por duas estruturas - como por exemplo o ladostigil, baseada em uma junção química de antagonistas de receptor NMDA e um inibidor da monoaminoxidase (MAO). Porém, essa nova classe de fármaco não foi capaz de atingir objetivos de retardar a progressão da doença, tendo seus ensaios clínicos encerrados (ATHAR; AL BALUSHI; KHAN, 2021; SCHNEIDER et al., 2019).

O desenvolvimento de medicamentos monoclonais está sendo fortemente pesquisado. Um exemplo disto é que em novembro de 2020 a agência *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA autorizou o uso do medicamento Aducanumab, um anticorpo monoclonal IgG1 anti- β A humano específicos para oligômeros β A e fibrilas, que estão envolvidas na DA. O aducanumab revelou-se capaz de diminuir os níveis de β A cerebral, mostrando melhorias clínicas nos pacientes portadores da doença (ALEXANDER; EMERSON; KESSELHEIM, 2021; AVGERINOS; FERRUCCI; KAPOGIANNIS, 2021). Esses anticorpos são proteínas projetadas especificamente para um antígeno, no caso para o β A que, ao identificar o epítipo, opsonizam o antígeno, levando à destruição dessa molécula (KOUHI et al., 2021). A partir deste mecanismo, outras imunoglobulinas tornaram-se alvo de pesquisas, e se mostram promissoras para o tratamento da DA (SUN et al., 2021).

Outras drogas com alvos distintos estão sendo estudadas. As terapias visam a inibição da BACE, a fim de limitar a produção de β A (FRANCIS, 2008), e de inibidores de γ -secretase, impedindo a formação de β A (SIEMERS et al., 2005). Além de tais drogas, também estuda-se os estimuladores de α -secretase, que através da ativação de proteína quinase C, reduzem os níveis de β A (COMAN; NEMEŞ, 2017). Por fim, há também os

inibidores de agregação amiloide e imunoterapias que agem na inibição da formação de placas amiloides (DELRIEU et al., 2012; YIANNOPOULOU; PAPAGEORGIOU, 2013).

Por outro lado, alguns fármacos já aprovados pela FDA ainda estão sendo testados para uso na DA. Na Tabela 1 podem ser observados os medicamentos em estudo, seu mecanismo de ação e o *status* do ensaio clínico. Além disso, outros fármacos que não são específicos para uso na DA, podem ser combinados na terapia para amenizar os sintomas demenciais e produzirem efeitos benéficos comportamentais, tais como antipsicóticos antagonistas de receptores dopaminérgicos, utilizados em momentos de agitação excessiva, e inibidores seletivos da recaptação de serotonina (HAMPEL et al., 2021; VASSAR, 2014).

Tabela 1. Mecanismo de ação e *status* de ensaios clínicos de alguns medicamentos anti-DA

	Nome	Mecanismo de ação	Status do ensaio clínico
1	Lanabecestat	Inibição reversível de BACE1	Fase 3 (encerrada em 2018)
2	Umibecestat	Inibição reversível de BACE1	Fase 2/3 (encerrada em 2019)
3	Tramiprosato *	Inibição da agregação BA	Fase 3 (descontinuada em 2007)
4	ALZ-801	Inibição da agregação BA	Fase 3 (em andamento)
5	Verubecestat	Inibição reversível de BACE1	Fase 3 (descontinuada em 2017)
6	Elenbecestat	Inibição reversível de BACE1	Fase 3 (descontinuada em 2019)
7	Atabecestat	Inibição reversível de BACE1	Fase 2/3 (em andamento)
8	Semagacestat	inibidor de γ -secretase	Fase 3 (encerrada em 2011)
9	Avagacestat	Inibidor de γ -secretase	Fase 2 (descontinuada em 2012)
10	Etazolato	Estimulador de α -secretase	Fase 2 (em andamento)
11	Acitretina *	Estimulador de α -secretase	Fase 2 (em andamento)
12	Epigalocatequina-galato *	Estimulador de α -secretase	Fase 2/3 (em andamento)
13	Tarenflurbil (MPC-7869)	Inibidor de γ -secretase	Fase 3 (terminada em 2009)
14	GV 971	Inibidor de agregação BA	Fase 3 (em andamento)
15	Colostrinina	Inibidor de agregação BA	Fase 2 (encerrada em 2009)
16	Bapineuzumabe	mAB anti-amiloide	Fase 3 (descontinuada em 2012)
17	Solanezumabe	mAB anti-amiloide	Fase 3 (em andamento)
18	Gantenerumabe	mAB anti-amiloide	Fase 3 (em andamento)
19	Aducanumabe *	mAB anti-amiloide	Aprovado (7 de junho de 2021)
20	Lecanemab	mAB anti-amiloide	Fase 3 (em andamento)
21	LMTM	inibidor de agregação de <i>tau</i>	Fase 3 (em andamento)
22	Blarcamesina	Ativador do receptor Sigma-1	Fase 2b/3 (em andamento)
23	Saracatinibe *	Inibidor de Src quinase	Fase 2a (terminada em 2018)
24	Thiamet G	<i>Inibidor da enzima O - GlcNAcase</i>	Fase 1 (em andamento)
25	Telmisartana *	Bloqueador do receptor da angiotensina II	Fase 2 (em andamento)

26	ALZT- OP1a	promotor de depuração BA	Fase 3 (em andamento)
27	Atuzaginstat	Inibidor irreversível de gingipain	Fase 2/3 (em andamento)
28	Masitinibe *	Inibidor de tirosina quinase	Fase 2b/3 (concluída)
29	Azeliragon	Receptor para inibidor de produtos finais de glicação avançada (RAGE)	Fase 3 (em andamento)
30	Enceniclina	Agonista α 7-nAChR parcial	Fase 3 (em espera clínica)
31	J-147	Inibidor da MAO-B	Fase 1 (em andamento)
32	Escitalopram *	Inibidor seletivo da recaptção de serotonina	Fase 3 (em andamento)
33	Brexipiperazol *	Agonista parcial dos receptores 5-HT 1A e dopamina D2 e D3	Fase 2/3 (em andamento)
34	Pioglitazona *	Agonista do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma	Fase 3 (encerrada em 2018)
35	Guanfacine *	Agonista do receptor adrenérgico α 2A	Fase 3 (em andamento)
36	Losartana *	Bloqueador do receptor da angiotensina II	Fase 2/3 (em andamento)
37	Minociclina *	Anti-inflamatório, inibe a inativação microglial	Fase 2 (descontinuada em 2019)
38	Nivaldipina *	Bloqueador de canais de cálcio	Fase 3 (Inativo desde 2018)
39	Liraglutida *	Agonista do peptídeo 1 semelhante ao glucagon	Fase 2b (em andamento)
40	Semaglutida *	Agonista do peptídeo 1 semelhante ao glucagon	Fase 3 (em andamento)
41	Aripiprazol *	Agonista de dopamina D2	Fase 3 (encerrada em 2016)
42	Lumateperona (ITI-007)	Antagonista de 5HT 2A , SSRI, modulador de fosfoproteína do receptor de GluN2B de glutamato	Fase 3 (encerrada em 2018, não cumpriu os objetivos do <i>endpoint</i> primário)
43	Idalopirdina	Inibidor de AChE e antagonista de 5HT-6	Fase 3 (descontinuada em 2017)
44	AVP-786	Antagonista do receptor NMDA	Fase 3 (em andamento)

* medicamento comercializado/aprovado US-FDA

Fonte: traduzido de Athar; Al Balushi; Khan, 2021.

1.4 ULTRASSOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE

Uma vez que os tratamentos existentes têm poucos efeitos sobre a progressão da doença, novas terapias para retardar a progressão da DA são necessárias, e a estimulação

cerebral não-invasiva de áreas cerebrais específicas poderia ser uma terapia promissora (LEGON et al. 2014). Desta forma, tal terapia pode atuar como adjuvante para tratar a doença ou até mesmo retardar seu desenvolvimento, sem efeitos adversos significativos, aumentando a qualidade de vida em pacientes com DA, bem como contribuir para o entendimento dos mecanismos que envolvem a memória e aprendizado (FOMENKO et al., 2018).

O campo da neuromodulação está crescendo significativamente na última década, utilizando-se de energia às redes cerebrais, que podem excitar, inibir ou interromper a dinâmica cerebral de forma controlada e indolor, que irão variar apenas em parâmetros como tempo, intensidade e área de aplicação (JOHNSON et al., 2013; KRAMES et al., 2009). Diante disso, tornando o UPBI uma forma alternativa e indolor, que podem oferecer especificidade e serem reversíveis, em comparação à alternativas medicamentosas ou cirúrgicas (EDELMAN et al., 2015).

O mecanismo completo do UPBI é ainda desconhecido, mas alguns fatores já foram elucidados (DALECKI 2004; HUANG et al. 2017). Sabe-se que ele age por meio de energia mecânica em intensidades bem baixas, sendo transmitida através do meio para células e tecidos como ondas acústicas de alta frequência (REPACHOLI et al., 1987). Essas ondas podem causar efeitos térmicos mínimos e principalmente não térmicos, que inclui neste, a formação de microbolhas, microjatos, induzidos através de cavitação, fluxo acústico e estimulação mecânica (LIN et al., 2016). Essa ondas podem gerar uma abertura rápida e transitória na barreira hematocerebral, o que facilita a administração de fármacos e nano partículas contribuindo para o tratamento de doenças (SU et al., 2017a). Além disso, esse mecanismo de entrega de moléculas ao cérebro pode contribuir para o diagnóstico de doenças neurológicas em exames que utilizem o contraste (LIPSMAN, et al. 2018, LIU, et al. 2020, MORSE, et al. 2019, YING et al. 2019).

O UPBI pode alterar as propriedades viscoelásticas das membranas celulares do sistema nervoso central (SNC), modulando a excitabilidade neuronal e a cinética de ativação dos receptores membranares (JOHNS, 2002; TYLER; TUFAIL; PATI, 2010). Ademais, o UPBI pode ter tem efeitos antioxidantes, diminuindo algumas espécies reativas (ZORTÉA et al. 2015). Em alguns experimentos foi possível observar que o UPBI foi capaz de modular positivamente os níveis de BDNF cerebral (CHEN et al., 2018; SU et al., 2017b)

O UPBI já demonstrou uma capacidade de estimulação neuronal diferente da gerada pelo ultrassom focado de alta intensidade (UFAl), sendo possível se obter efeitos neurais reversíveis, cumprindo requisitos de segurança do FDA (BYSTRITSKY; KORB, 2015;

TYLER; LANI; HWANG, 2018; WANG et al., 2019). Além disso, ondas ultrassônicas já foram utilizadas em modelos experimentais de isquemia cerebral e DA — resultando em aumento da expressão neurotrófica, diminuição das lesões cerebrais, melhora na aprendizagem e memória, e alterações de morfologia neuronal em roedores (BAEK et al., 2018; GUO et al., 2015; LIN et al., 2015; NOTTURNO et al., 2014; ZHENG et al., 2020). Ademais, outras aplicações já foram investigadas experimentalmente, como a inibição de respostas inflamatórias e neuromodulação, como o equilíbrio entre atividade da microglia M1 e M2 (pró e anti-inflamatória), diminuição de IL 10 e outras citocinas (QIN; LUO; ZHU, 2022; SU et al., 2017a).

Visto os efeitos benéficos do UPBI, pretende-se avaliar se essa terapia poderia diminuir danos ao cérebro: radicais livres e neuroinflamação e aumentar níveis de neurotrofinas e citocinas anti-inflamatórias, além de diminuir prejuízos à memória. O objetivo deste estudo é auxiliar no desenvolvimento de tais métodos, como por exemplo, através do uso do UPBI, possível terapia alternativa pouco invasiva, onde trata-se apenas de aplicar o aparelho de ultrassom focado em contato com o crânio por alguns minutos em intensidade controlada. Vários resultados puderam ser observados, os quais podem auxiliar a entender os mecanismos envolvidos da doença e a sua resposta a terapia apresentada, bem como, o mecanismo da própria terapia.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Geral

Avaliar o tratamento ultrassom pulsado de baixa intensidade transcraniano em um modelo da doença de Alzheimer induzido pela injeção intracerebroventricular de βA_{1-42} e seus efeitos em parâmetros comportamentais e bioquímicos.

1.5.2 Objetivos Específicos

- I. Analisar o efeito da terapia com UPBI sobre a memória e aprendizagem em modelos de DA induzida por βA_{1-42} ;
- II. Analisar o efeito da terapia com UPBI sobre parâmetros tróficos, BDNF e NGF, em modelos de DA induzida por βA_{1-42} ;
- III. Analisar o efeito da terapia com UPBI sobre parâmetros pró e anti-inflamatórios, IL-1, INF- γ e IL-10, em modelos de DA induzida por βA_{1-42} ;
- IV. Analisar o efeito da terapia com UPBI sobre parâmetros de estresse oxidativo e nitrosativo, DCFH e Nitrito, em modelos de DA induzida por βA_{1-42} ;
- V. Analisar o efeito da terapia com UPBI sobre danos celulares, carbonilação de proteínas, em modelos de DA induzida por βA_{1-42} ;
- VI. Analisar o efeito da terapia com UPBI sobre parâmetros anti-oxidantes, SOD e GSH, em modelos de DA induzida por βA_{1-42} ;

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Para realização da experimentação, utilizaram-se ratos machos da espécie: *Rattus norvegicus*, linhagem: Wistar (n=27), com 8 semanas de idade, com faixa de peso entre 250 a 300g, originados e mantidos do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense-UNESC. Os animais foram alojados gaiolas com livre acesso a alimentos e água, em condições ambientais padrão, ciclo claro/escuro de 12 horas. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética local de Uso de Animais (CEUA) 088.2015-1, todos os procedimentos foram realizados por pessoas capacitadas por este comitê e pelas Diretrizes Brasileiras de Cuidado e Uso de Animais para Fins Científicos e Didáticos (RN nº 12/2013 - MCTC). Dividiu-se os animais em três grupos, sendo eles: grupo sham n=9; grupo intervenção βA_{1-42} (400pmol/rato) n=9; e grupo intervenção e terapia βA_{1-42} (400pmol/rato) + UPBI n=9.

2.2 CIRURGIA

Para induzir o modelo de doença de Alzheimer os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica. O procedimento anestésico ocorreu por injeção intraperitoneal de uma combinação de fármacos: cetamina - 100 mg/kg de peso corporal (Schering-Plough Coopers, Brasil) e xilazina - 10 mg/kg de peso corporal (Coopazine; Syntec, Brasil). A cirurgia ocorreu com o auxílio de um equipamento estereotáxico, realizou-se pequena exérese do tegumento na parte superior do crânio, entre as orelhas, a fim de visualizar o bregma. Com um aparato perfurador, foi realizado um pequeno orifício no hemisfério direito 1 mm posterior a bregma, 2 mm lateral e 3 mm de profundidade (medidas aproximadas), para que neste realiza-se a infusão intracerebroventricular (ICV) de solução salina 0,9% (sham) ou solução contendo oligômeros de βA_{1-42} (400pmol) (intervenção) (LAURSEN; BELKNAP, 1986).

Os oligômeros foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, suspendendo o liofilizado com tampão fosfato e incubados a 37°C por 7 dias, posteriormente, aliquotados e armazenados a -20°C (Sigma-Aldrich, 2012).

2.3 TERAPIA UPBI

O tratamento com UPBI iniciou 24 horas após a cirurgia estereotáxica. Os animais foram previamente anestesiados em sistema de anestesia fechado, numa caixa acrílica de indução com um fluxo de 2,5 litros/minuto de oxigênio com 4% de isoflorano. Após isso, foram mantidos a 2% de isoflorano com inalação contínua, através de um equipamento específico da Insight (AI 100 - Anestesia Inalatória). A parte superior do crânio, entre as orelhas e logo após os olhos, foi o local de aplicação da terapia, e para que as ondas fossem penetradas no crânio utilizou-se gel condutor de Carbopol.

O equipamento indutor das ondas esteve contato direto com o gel e o crânio do rato, nos parâmetros: intensidade de 0,8 W/cm², frequência central de 3,3 MHz \pm 10%, alteração por onda seno com ciclo de 50%, largura de pulso de 5 ms e frequência de repetições pulsadas 100 Hz e transdutor do dispositivo com as seguintes dimensões geométricas: Área aplicada ou face transdutor (diâmetro de abertura) = 44,0 \pm 0,3 mm; Tipo de feixe = Collimated; AIE (Área de Irradiação Eficaz) = 7,0 cm²; BNR (Relação de Não-deformidade do Feixe) = 3 (Ibramed, 2012). A frequência da aplicação da terapia ocorreu a cada 48 horas, no mesmo horário, no tempo de 5 minutos por animal, durante 5 semanas. Os animais que não receberam terapia UPBI foram apenas anestesiados da mesma forma

2.4 RECONHECIMENTO DE OBJETOS

Na última semana de tratamento com UPBI, foi realizado o teste comportamental para avaliar a função cognitiva, memória de curto e longo prazo dos animais utilizando, para isso, o teste de reconhecimento de objetos. Para adaptação dos animais ao novo ambiente e aparato, no primeiro dia, um a um, eles foram alocados em caixa de madeira revestida de material impermeável na cor preta, com dimensões de 90x90x90 cm, posicionada no chão em uma sala à prova de som com iluminação difusa. por 10 minutos. No segundo dia, um a um, eles foram familiarizados com dois objetos plásticos idênticos em forma, cor, textura e tamanho (A + A), sendo esta a fase de treinamento. Após 90 minutos, a memória de curto prazo foi avaliada, onde um dos objetos foi substituído por um novo objeto que diferia em forma, cor, textura e tamanho (A + B). Após 24 horas, terceiro dia, a memória de longo prazo ou a retenção da memória foi avaliada através de um novo teste, onde, novamente, um dos

objetos foi substituído por um novo objeto que difere em forma, cor, textura e tamanho (A + C).

Cada sessão de teste durou 5 minutos e o tempo gasto explorando cada objeto foi mensurado. O index de reconhecimento foi avaliado da seguinte forma: $TN/TN + TF$ (TN = tempo gasto explorando o novo objeto, B ou C; TF = tempo gasto explorando o objeto familiar, A). A caixa e todos os objetos foram completamente limpos com álcool entre os testes para remover odores residuais. O reconhecimento foi definido como um ato no qual o animal se aproximaria do objeto a aproximadamente 2 cm de distância, cheiraria e/ou tocaria no objeto com a ponta do nariz e/ou com as patas. Quando o rato estava ao lado ou em cima do objeto, isso não foi considerado uma atividade exploratória (Antunes e Biala 2012).

2.5 EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

A eutanásia foi realizada 24 horas após o último dia do teste de reconhecimento de objeto. O hipocampo e o córtex foram extraídos de ambos os hemisférios cerebrais. Parte das estruturas foram homogeneizadas em um tampão adequado, de acordo com a técnica a ser realizada e o restante foi armazenado a uma temperatura de -80°C para procedimentos técnicos futuros.

2.6 LINHA DO TEMPO EXPERIMENTAL

Para melhor ilustrar o período experimental com os animais , foi confeccionada a linha do tempo experimental, ilustrando as etapas do experimento, onde a mesma é demonstrada na figura 5.

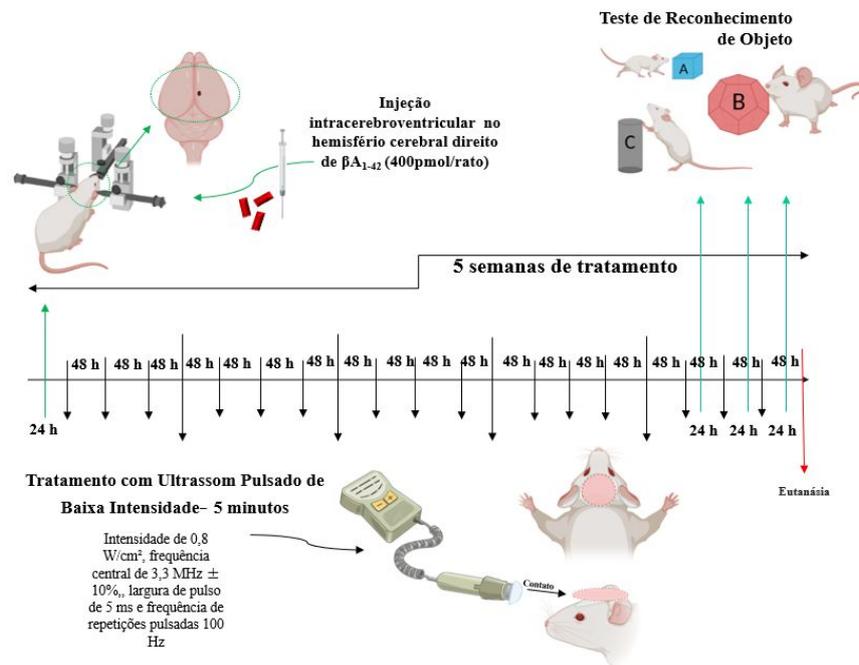


Figura 6. **Desenho experimental.** Após anestesia, os animais receberam uma injeção ICV de βA_{1-42} e 24 h após iniciou-se o tratamento UPBI a cada 48 h durante 5 semanas. A tarefa de reconhecimento de objetos foi realizada, ao fim do experimento ocorreu a eutanásia.

Fonte: a autora.

2.7 ELISA

O hipocampo e o córtex foram homogeneizados em tampão de lise de imunoprecipitação e após centrifugados. Os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator de crescimento nervoso- β (NGF- β) (Sistemas de P&D, Minneapolis, EUA), IL-1 β , IF- γ e IL-10 (Invitrogen, Califórnia, EUA) foram avaliados usando kits ELISA disponíveis. Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Os valores foram calculados com base em uma curva padrão para cada ensaio e expressos em proteína pg/mg.

2.8 PARÂMETROS OXIDATIVOS

Para avaliar os parâmetros oxidativos, as estruturas, hipocampo e córtex, foram homogeneizadas em tampão fosfato de 50 mM com KCl 20 mM, a suspensão resultante foi

centrifugada a $3000 \times g$ por 10 min e o sobrenadante foi separado para análises posteriores (LEBEL; BONDY, 1990).

2.9 QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO

Os níveis de nitrito foram avaliados por ser um metabólito mais estável do óxido nítrico. As amostras foram incubadas em reagente Griess (1% sulfanilamida em HCl 0,1 mol/L e 0,1% N-dihidrato [1-naftil] diamina de etileno) à temperatura ambiente por 10 minutos e a absorção foi aferida espectralmente em comprimento de onda de 540 nm. Os valores foram calculados com base em uma curva padrão para cada ensaio e expressos em $\mu\text{Mol} / \text{mg}$ proteína, um curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabólito nitrito de sódio (NaNO_2) (CHAE et al., 2004).

2.10 DETERMINAÇÃO DO DCFH

Os níveis intracelulares de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) foram monitorados em amostras incubadas com 2,7-diclorofluoresceína (DCF) (10mM) a 37°C por 30 min. A formação do derivado fluorescente oxidado foi analisada em comprimentos de onda de excitação e emissões de 488 e 525 nm, respectivamente, utilizando um espectrofotômetro de fluorescência. Uma curva padrão DCFH foi construída utilizando DCF (concentração de 10 nM) como controle interno no experimento e os resultados foram expressos como intensidade de fluorescência (DONG; SULIK; CHEN, 2010; LEBEL; BONDY, 1990).

2.11 MEDIÇÃO DE DANO OXIDATIVO

O dano oxidativo foi analisado através grupos carbonila presente nas proteínas das células dos tecidos analisados. Após o preparo prévio das amostras, foram adicionados a ácido tricloacético 20%, centrifugadas a $14400 \times g$, ressuspendidas e adicionadas ácido clorídrico 2M e ou 2'-Desoxiadenosina 5'-trifosfato 10mM (dNTP), descartou-se o sobrenadante, adicionou-se etanol-etilacetato, homogeneizou-se e ressuspendeu-se novamente as amostras, análise foi realizada espectrofotometricamente a 370nm, os resultados foram calculados e expressos em nmol/mg de proteína (AUGUSTYNIAK et al., 2015).

2.12 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A atividade antioxidante de superóxido dismutase de enzimas (SOD) foi avaliada inibindo a oxidação da adrenalina. As estruturas do hipocampo e do córtex foram homogeneizadas em tampão glicina, depois inseridas à placa 5, 10 e 15 μL , em seguida adicionadas às amostras 5 μL de catalase, 175-185 μL de tampão glicina e 5 μL de adrenalina. As leituras foram realizadas em 180 s, com intervalos de 10 s e medidas em um leitor de placas a 480 nm. Os valores foram expressos em unidades SOD por miligrama de proteína (WEYDERT; CULLEN, 2010).

Foram avaliados os níveis de glutathiona enzimática antioxidante (GSH). O GSH foi medido em homogeneizados teciduais após precipitação proteica usando ácido tricloroacético de 10%. Após tal procedimento, uma alíquota de amostra foi adicionada a um tampão fosfato de 800 mM contendo DTNB 500 mM. O desenvolvimento de cores resultante da reação entre NBD e tiols atingiu o pico em 5 minutos e permaneceu estável por 30 minutos. A fluorescência foi determinada em 412 nm após 10 min. Uma curva padrão, construída com glutathiona reduzida, foi utilizada para calcular os níveis de GSH nas amostras (HISSIN; HILF, 1976).

2.13 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO

Para determinar o teor de proteína, o córtex e o hipocampo foram homogeneizados utilizando-se albumina soro padrão e reagente fosfomolibdico-fosfotúngstico (Folin fenol), de acordo com a técnica, as amostras foram analisadas em absorbância com comprimento de onda de 750 nm (Lowry et al. 1951).

2.14 ESTATÍSTICA

Os dados foram testados para normalidade usando o teste Shapiro-Wilk, observada a normalidade, em sequência realizou-se uma análise de variância (ANOVA), seguida pela análise pós-hoc pelo teste Tukey, no software GraphPad Prism. Os dados foram expressos

como \pm desvio padrão (DP) e considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. Os dados da tarefa de reconhecimento de objetos foram analisados através do teste T.

3 RESULTADOS

3.1 MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO

Para analisar a função de aprendizagem e memória de curto e longo prazo utilizou-se a tarefa de reconhecimento de objetos. A memória de curto prazo, retém uma quantidade limitada de informação durante um período curto de tempo. Na memória de longo prazo, armazena-se a informação por tempo indeterminado. Na fase de treinamento, não houve diferença no index de reconhecimento entre os grupos (A+A). O grupo βA_{1-42} não demonstrou diferença significativa entre o index de reconhecimento do objeto, tanto na memória de curto prazo quanto de longo prazo (A + B; A + C). Os animais dos grupos sham e βA_{1-42} + UPBI mostraram um aumento significativo no index de reconhecimento do novo objeto (A + C), na memória de curto prazo e na memória de longo prazo (Figura 7).

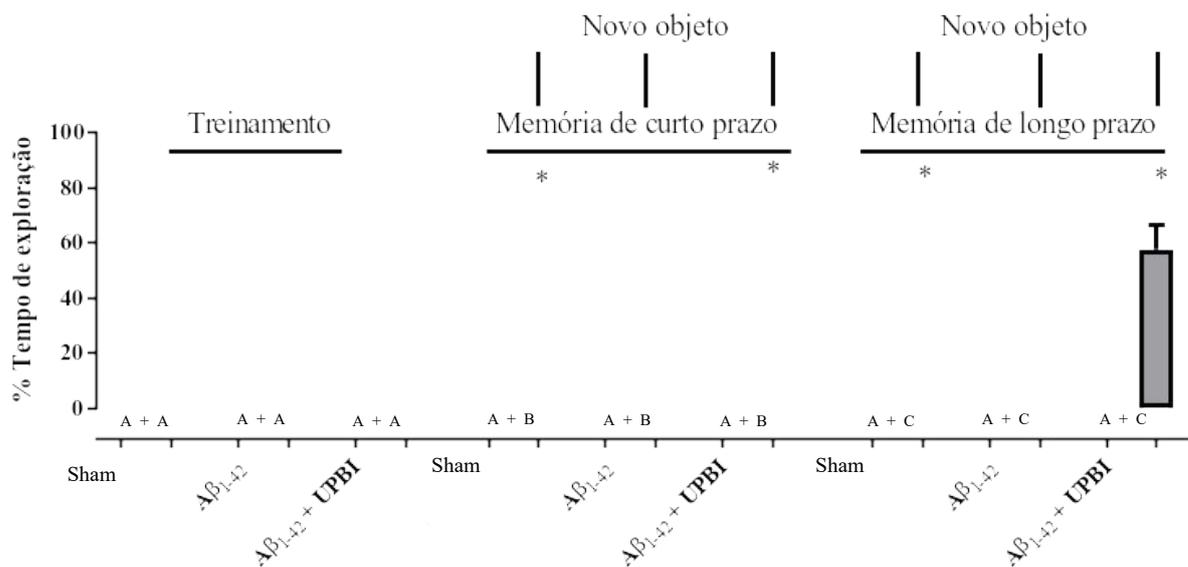


Figura 7. **Tarefa de reconhecimento de objetos.** Todos os animais desmontaram index semelhantes de exploração dos objetos na fase de treinamento. Na memória de curto e longo prazo, os animais no sham e βA_{1-42} + UPBI mostraram maior index no novo objeto em comparação com o antigo (novo objeto > objeto antigo; * $p < 0.05$). Os animais do grupo βA_{1-42} não mostraram diferença significativa entre objetos em memória curta e longa. Média \pm DP, $n = 9$.

3.2 FATORES NEUROTRÓFICOS

Os processos de aprendizagem e memória também são modulados por fatores neurotróficos, diante disso, avaliaram-se os níveis de BDNF e NGF- β . Os níveis de BDNF foram reduzidos significativamente no córtex no grupo βA_{1-42} , em comparação com outros grupos (Figura 8A). Entretanto, no hipocampo, houve aumento do BDNF no grupo βA_{1-42} + UPBI, em comparação com outros grupos (Figura 8B). Da mesma forma, os níveis de NGF- β foram diminuídos significativamente no córtex no grupo βA_{1-42} , em comparação com outros grupos (Figura 8C). No hipocampo, os níveis de NGF foram elevados de forma significativa no grupo βA_{1-42} + UPBI, em comparação com outros grupos (Figura 8D).

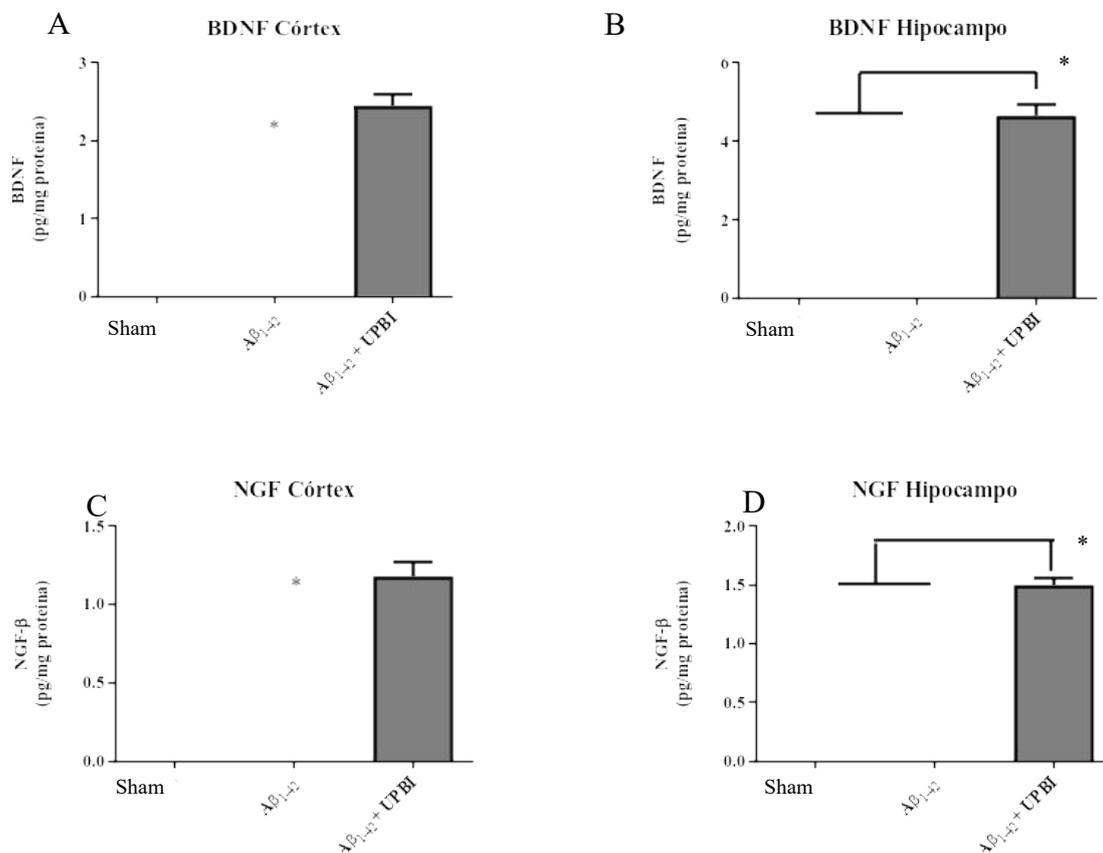


Figura 8. Níveis de neurotrofinas no córtex e hipocampo. **A e C**- Os níveis de BDNF e NGF- β foram reduzidos no córtex dos animais do grupo βA_{1-42} em comparação com outros grupos (* βA_{1-42} < Sham e βA_{1-42} + UPBI; $p < 0,05$). Média \pm DP, $n = 6$. **B e D** – houve aumento de BDNF e NGF- β no grupo βA_{1-42} + UPBI no hipocampo em comparação com outros grupos (* βA_{1-42} + UPBI > Sham e βA_{1-42} ; $p < 0,05$). Média \pm DP, $n = 9$.

3.3 NEUROINFLAMAÇÃO

O βA_{1-42} é um fator que pode afetar o status inflamatório cerebral, desta forma, alguns níveis de citocinas pré e pró-inflamatórias foram analisados. No córtex e no hipocampo, os níveis de IL-1 β não foram alterados significativamente pela terapia UPBI (Figura 9A e B). Da mesma maneira, não houve diferença significativa nos níveis de INF- γ no córtex e hipocampo dos animais tratados ou não com UPBI (Figura 9C e 4D). Igualmente, os níveis de IL-10 não foram alterados no córtex (Figura 9E), mas foram aumentados significativamente no hipocampo do grupo βA_{1-42} + UPBI, em comparação com os grupos Sham e βA_{1-42} (Figura 9F).

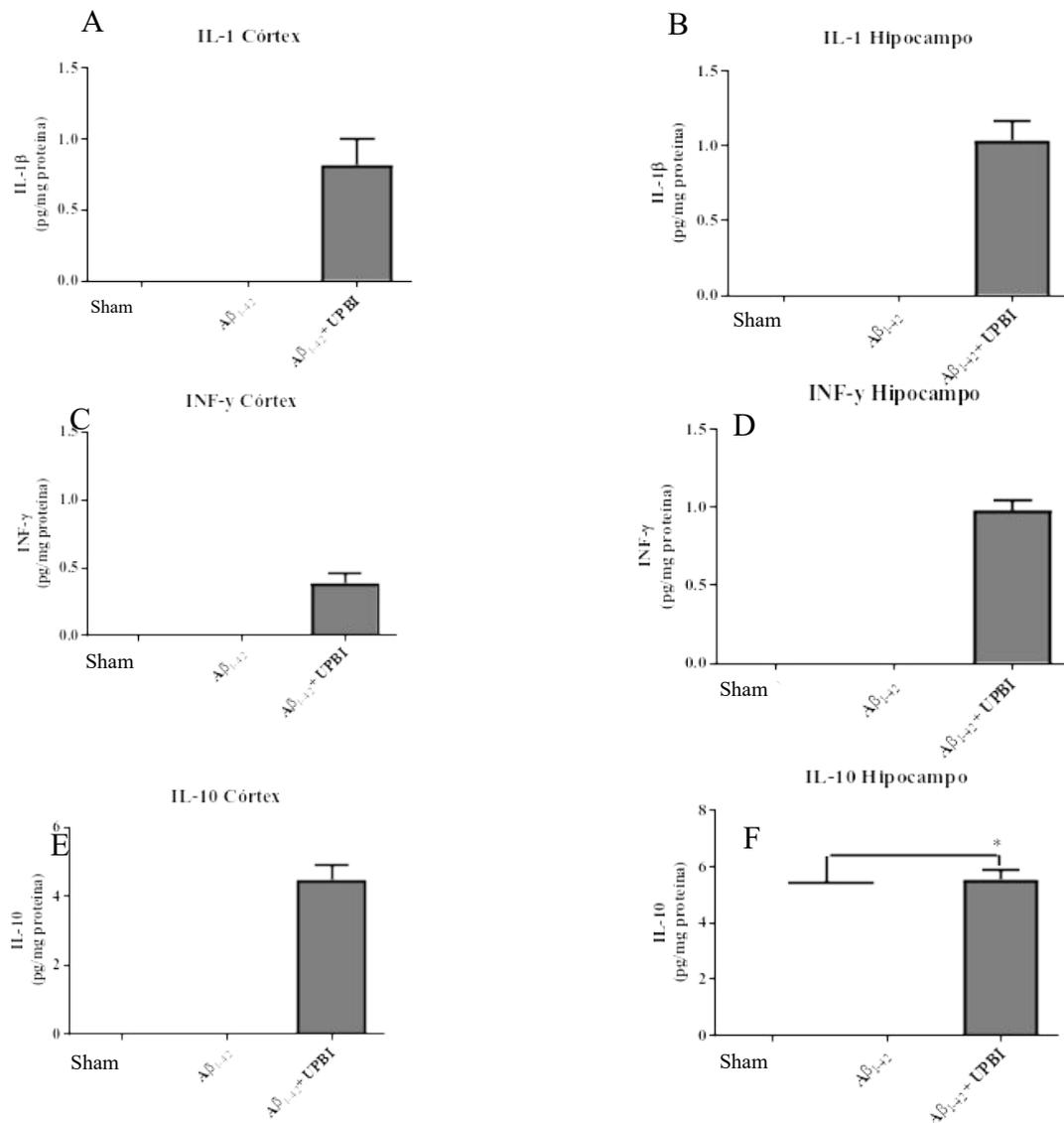


Figura 9. **Neuroinflamação. A, B, C, D, E** - Os níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (A e B) e INF- γ (C e D) nos grupos córtex e hipocampo não foram alterados nos grupos β A₁₋₄₂ e β A₁₋₄₂ + UPBI, bem como, IL-10 (E). **F** - Os níveis de IL-10 foram aumentados de forma significativa no grupo β A₁₋₄₂ + UPBI em comparação com outros grupos (* β A₁₋₄₂ + UPBI > Sham e β A₁₋₄₂; p<0.05) Média \pm DP, n = 9.

3.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO

A produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em excesso, compõe o quadro de estresse oxidativo, desta forma fez-se necessário avaliar tais marcadores. Observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos nos níveis de DCFH tanto no córtex quanto no hipocampo (Figura 10A e B). Porém, houve um aumento nos níveis de nitrito no córtex em animais do grupo β A₁₋₄₂ + UPBI, em comparação com o grupo sham (Figura 10C), bem como, aumento significativo nos níveis de nitrito no hipocampo dos animais do grupo β A₁₋₄₂ + UPBI, em comparação com o grupo β A₁₋₄₂ (Figura 10D).

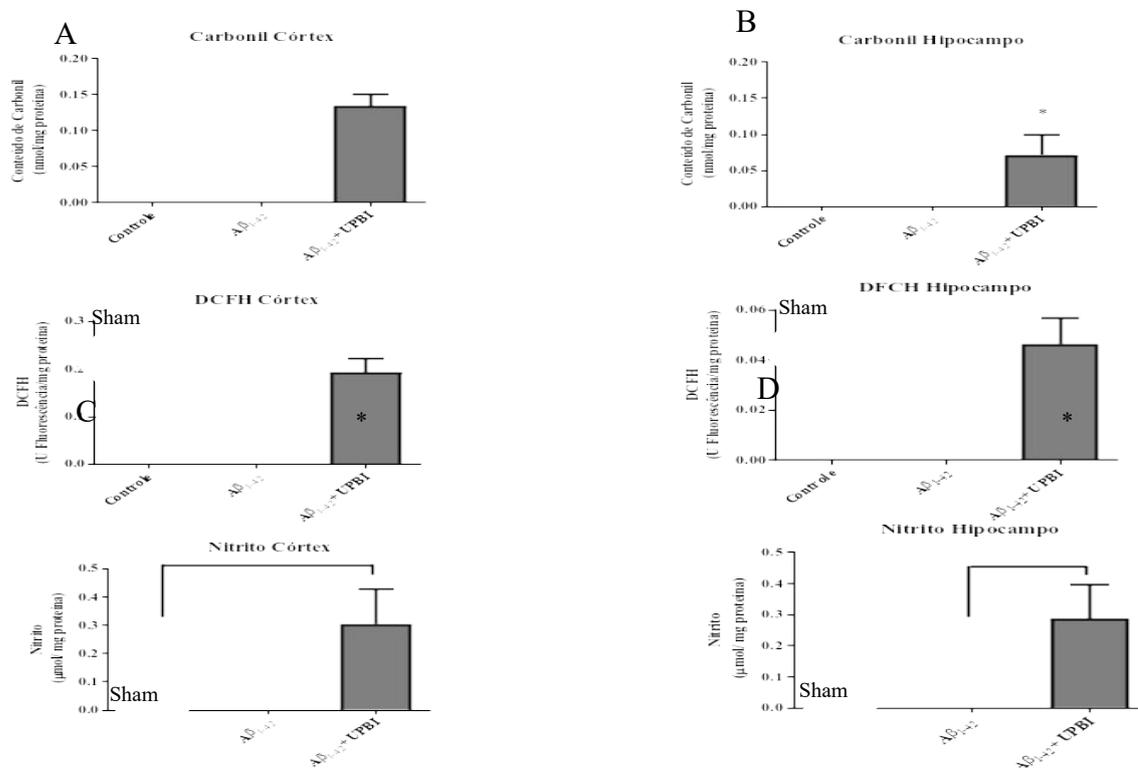


Figura 10. **Marcadores de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.** **A e B** - Não houve diferenças significativas entre os grupos nos níveis de DCFH no córtex e no hipocampo. **C** - Os níveis de nitrito foram aumentados no córtex do βA_{1-42} + UPBI em comparação com o grupo sham ($*\beta A_{1-42}$ + UPBI > Sham; $p < 0,05$). **D**- Os níveis de nitrito foram aumentados no hipocampo do βA_{1-42} + UPBI em comparação com o grupo βA_{1-42} ($*\beta A_{1-42}$ + UPBI > βA_{1-42} ; $p < 0,05$). Média \pm DP, n = 9.

3.5 DANO PROTEICO

Os níveis de carbonilação das proteínas foram avaliados para determinar o dano proteico. Não foi observada diferença significativa no córtex em nenhum dos grupos (Figura 11A). Houve uma significativa diminuição nos níveis de grupo carbonil em proteínas no hipocampo de animais do grupo βA_{1-42} + UPBI, em comparação com o grupo sham (Figura 11B). Média \pm DP, n = 9.

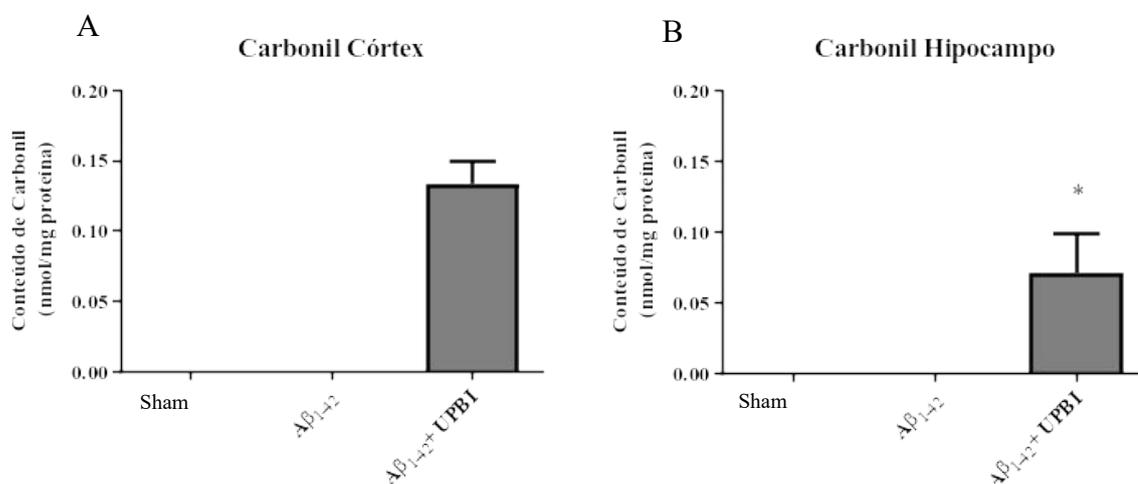


Figura 11. **Marcador de dano proteico.** **A** - Não houve diferenças entre os grupos no conteúdo de carbonil no córtex. **B** - Os níveis de proteínas carboniladas foram diminuídos no grupo βA_{1-42} + UPBI em comparação com outros grupos ($*\beta A_{1-42}$ + UPBI > Sham e βA_{1-42} ; $p < 0,05$). Média \pm DP, n = 9.

3.6 ESTADO ANTIOXIDANTE

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), bem como, os níveis de glutathiona foram mensurados para determinar a capacidade antioxidante. A atividade SOD no córtex foi diminuída de forma significativa nos grupos βA_{1-42} e $\beta A_{1-42} + UPBI$, em comparação com o grupo sham (12A). No hipocampo, não foram observadas diferenças significativas na atividade SOD (12B). Os níveis de GSH não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, tanto no córtex quanto no hipocampo (12C e D).

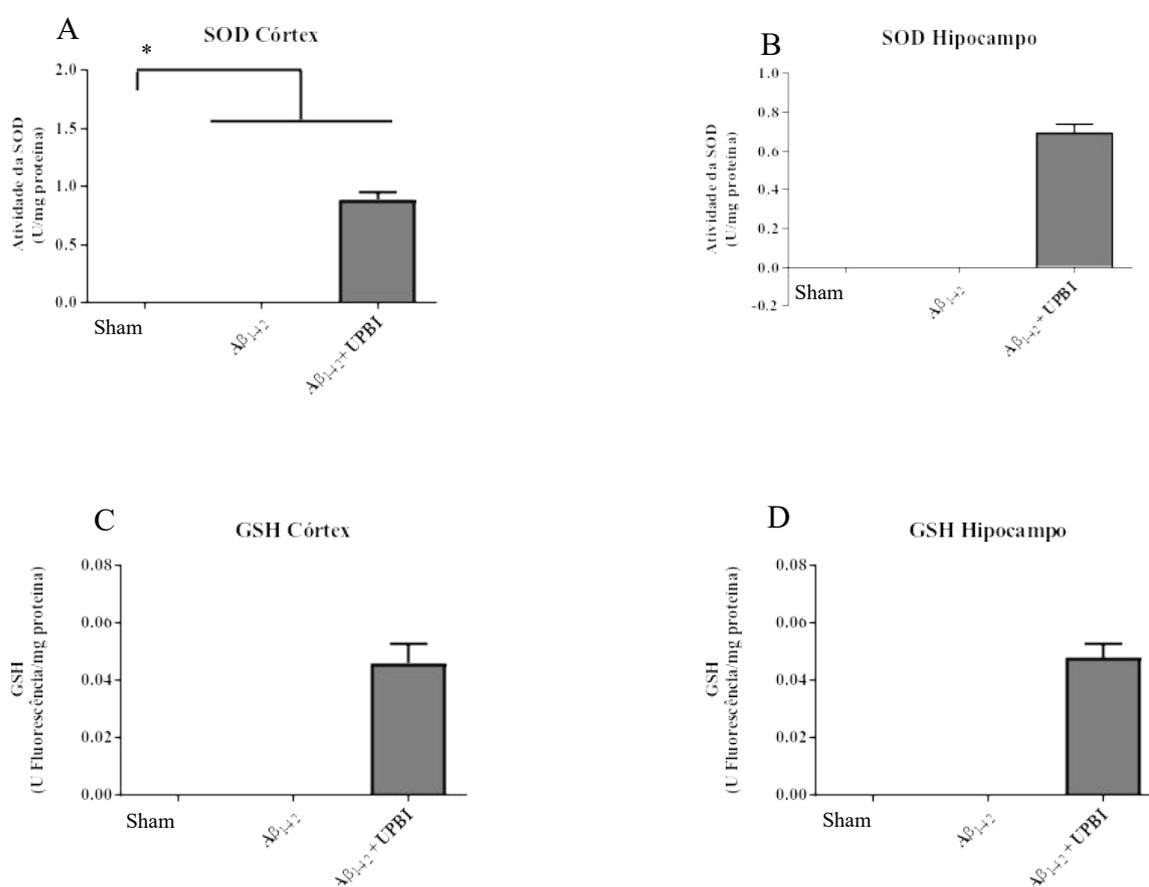


Figura 12. **Enzimas antioxidantes.** **A** - A atividade SOD foi diminuída nos grupos βA_{1-42} e $\beta A_{1-42} + UPBI$ em comparação com o grupo sham (*Sham > βA_{1-42} e $\beta A_{1-42} + UPBI$; $p < 0.05$) **B** - A atividade SOD não foi alterada pelo tratamento no hipocampo. **C e D** - Os níveis de GSH não foram alterados no córtex e no hipocampo. Média \pm DP, $n = 9$.

4 DISCUSSÃO

O Alzheimer é uma doença difícil de tratar, devido à sua progressão, e medicamentos ou métodos não invasivos existentes não são capazes de prevenir ou reverter os danos causados ao paciente (SCHELTENS et al, 2016). Na indústria farmacêutica, há vários medicamentos capazes de amenizar os sintomas da doença em seus estágios iniciais, sendo que os mecanismos destes variam entre inibidores das colinesterases e antagonistas de receptores NMDA. Porém, devido à evolução da doença, os medicamentos vão diminuindo a sua eficácia no combate dos sintomas psíquicos ao longo do tempo (BRIGGS; KENNELLY; O'NEILL, 2016). Atualmente, desenvolver medicamentos ou métodos confiáveis e eficazes contra a progressão da DA é um desafio (ATHAR; AL BALUSHI; KHAN, 2021). Em nosso estudo propomos uma nova abordagem de tratamento da DA, através do uso do UFBI, por ser indolor e com pouco desconforto ao paciente, além de ser seguro e eficaz.

O peptídeo βA_{1-42} é um dos principais marcadores cerebrais da DA, assim como as os emaranhados de proteína TAU e excitotoxicidade glutamatérgica (FRANCIS, 2008). Os primeiros sintomas da doença envolvem o déficit cognitivo, perda memória e dificuldade de aprendizado, bem como modelos de demência ou DA utilizando βA_{1-42} , que também têm demonstrado déficits cognitivos e o prejuízo de memória de reconhecimento (BENTON, 2010). Em testes cognitivos utilizando o labirinto aquático de Morris, animais expostos a modelos de DA βA_{1-42} apresentaram maior latência para encontrar à plataforma (LEE; CHU; CHIANG, 2021; MORRONI et al., 2016). Nossos resultados indicam que o tratamento com UPBI reverteu o comprometimento no processo de memória de aprendizagem. Os animais que receberam apenas a injeção ICV de βA_{1-42} demonstraram maior prejuízo na memória. Corroborando com nosso estudo, outros estudos demonstraram que o prejuízo na memória de reconhecimento é característica deste modelo de DA (JIANG et al, 2019; BLACKMORE et al., 2019; SHIN et al., 2019; SU et al., 2017). O ultrassom terapêutico em modelos animais de DA apontaram melhorias significativas na cognição, além de melhoras graduais, à medida que o número de sessões fosse aumentado (GÖTZ; RICHTER-STRETTON; CRUZ, 2021; CHEN et al. 2018; HUANG et al. 2017; LIN et al. 2015). O ultrassom juntamente com anticorpos anti- βA foi capaz de demonstrar melhora 5 vezes maior na memória espacial em camundongos, após 3 dias de tratamento, em comparação com os que receberam apenas o anticorpo (LEINENGA; KOH; GÖTZ, 2021).

O ultrassom pode aliviar o comprometimento cognitivo e melhorar a memória em camundongo transgênicos com DA. Além disso, reduz significativamente placas amiloides, e juntamente com as microbolhas induziu a fagocitose de βA_{1-42} pela microglia (BURGESS et al., 2014; PANDIT; LEINENGA; GÖTZ, 2019; SHEN et al., 2020). Autores também puderam relatar aumento de neurogênese e melhora na função de receptores sinápticos NMDA, induzidos por ultrassom, mecanismos que impactam no bom funcionamento cerebral, bem como melhora cognitiva (BLACKMORE et al., 2021)

As neurotrofinas, produzidas por células cerebrais são responsáveis por fazer a manutenção dos neurônios, bem como plasticidade neuronal (KHAN; SMITH, 2015). Vários modelos animais de DA demonstram diminuição de fatores neurotróficos, principalmente BDNF e NGF- β (IULITA et al. 2017; PHILLIPS et al. 1991). Essas neurotrofinas são essenciais para a formação de novas memórias, assim como o aprendizado e desenvolvimento cognitivo, desta forma, modelos animais com níveis reduzidos destes fatores tróficos apresentam piores resultados em testes cognitivos em comparação com animais saudáveis (PARK; POO, 2013).

Em outro experimento utilizando modelo animais foram capazes de apresentar que o BDNF tem efeito neuroprotetor contra a toxicidade βA , através do aumento da ativação de TrkB, comprovando que a via de sinalização BDNF/TrkB pode ter um papel importante contra a patogênese da DA (ARANCIBIA et al., 2008). A regulação dessa via, de forma negativa, está associada a perda sináptica e déficit cognitivo, essa regulação pode ocorrer acúmulo de βA cerebral e também por aumento de citocina pró-inflamatórias, como TNF α e IL-1 β (WU et al., 2021).

Nosso estudo foi capaz de demonstrar que modelos animais do modelo de DA que não receberam a terapia com UPBI tiveram menores níveis de neurotrofinas, BDNF e NGF- β , em córtex, comparado com o grupo sham. Já em hipocampo, o grupo βA_{1-42} que recebeu a terapia com UPBI apresentou aumento significativo nos níveis tróficos, em comparação ao grupo sham e grupo βA_{1-42} , que não recebeu a terapia. O tratamento com UPBI pode manter ou até aumentar os níveis dessas neurotrofinas, tendo em vista que estes fatores tróficos tem grande importância na cognição e manutenção das memórias, aumentar ou manter os níveis dessas neurotrofinas é essencial para bom funcionamento cerebral, reforçando a ligação entre conteúdo de BDNF e NGF- β e comprometimento cognitivo (LYNCH, 2004; YANG et al., 2015).

A neuroinflamação é um mecanismo necessário para manutenção cerebral, atuando como protetor contra lesões. No entanto, quando se prolonga e se torna crônica pode induzir a neurodegeneração, como observado em modelos animais de neuroinflamação (TRAMONTIN et al., 2020; SIMON et al., 2020). Autores mostraram que a injeção de βA_{1-42} causou picos de IL1 β , TNF- α em 21 dias, bem como, diminuição de atividades antioxidantes, em conjunto com ativação microglial e a expressão de mRNA de fatores inflamatórios (OYELEKE; OWOYELE, 2022; XU et al., 2018).

Em nossos resultados não foi possível observar diferenças significativas nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , IFN- γ . Apenas da citocina anti-inflamatória IL-10, no hipocampo, onde pôde-se verificar aumento significativo em comparação aos demais grupos quando utilizada a terapia com UPBI. Estudos demonstraram que, após 6 dias de tratamento com ultrassom juntamente com microbolhas, foi possível observar uma resposta imune inata, evidenciada pela infiltração no SNC de monócitos/macrófagos (KOVACSA et al., 2017). Os resultados dos marcadores inflamatórios após 5 semanas em nosso modelo βA_{1-42} poderiam ter sido diferentes se tivéssemos avaliado anteriormente, no início do experimento, e esta questão merece novos experimentos específicos para estudá-lo.

Diversas intensidades de terapias utilizando o UPBI podem reduzir alguns fatores pró-inflamatórios em culturas celulares e melhorar a recuperação de lesões musculares, acelerando o processo de diapedese, migração macrófagos, ao local lesionado, fase aguda da inflamação (DA SILVA JUNIOR et al., 2017). Em adição a isso, diferentes tempos de tratamento com UPBI é capaz de diminuir os níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumentar fatores neurotróficos em culturas celulares de células cerebrais, astrócitos e microglia (CHANG et al., 2020; DA SILVA JUNIOR et al., 2017; ZHANG et al., 2017). A terapia com ultrassom é capaz de facilitar a absorção de fatores transmitidos pelo sangue, a fim de ativar a microglia, células que também absorvem o βA_{1-42} em seus lisossomos e os digerem, realizando a depuração do βA_{1-42} , que quando combinada com anticorpos anti- βA podem gerar resultados mais eficazes (GÖTZ; RICHTER-STRETTON; CRUZ, 2021).

A inflamação crônica pode gerar danos neurocelulares, a prevenção ou modulação negativa da via inflamatória tem grande impacto na preservação da função cognitiva normal em modelo de DA induzido por BA_{1-42} (CRISTIANO et al., 2019). Porém, em nosso estudo não foram observadas mudanças significativas em parâmetros inflamatório, mas sim em parâmetros cognitivos e tróficos. Em outro estudo demonstrou-se que o tratamento com UPBI

diminuiu o comprometimento da memória induzido por neuroinflamação, através da inibição da sinalização da TLR4/NF-Kb, reduzindo mediadores inflamatórios, bem como, aumento da expressão de BDNF no hipocampo em camundongos modelos de DA a partir de LPS, demonstrando efeitos protetores contra a neurotoxicidade do βA_{1-42} , além de diminuir a expressão de βA_{1-42} e APP, além de inibir a atividade da caspase 3 (CHEN; LAN; YANG, 2019).

O processo inflamatório conta com algumas moléculas necessárias para o reparo de lesão ou insultos ao cérebro, e os radicais livres são moléculas que fazem parte do sistema de defesa. Porém, quando há um desbalanço das mesmas, podem haver lesões neurocelulares e até a apoptose, podendo, em alguns casos, levar à alteração da função cognitiva e atrapalhar o processo de memorização (GHOSH et al., 2021). Essas moléculas são as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que também exercem funções fisiológicas benéficas, com mecanismos de defesa bem definidos (BAILEY et al. 2019; BUTTERFIELD e BOYD-KIMBALL 2018).

A espécies reativas de oxigênio, quando em excesso, caracterizam o estresse oxidativo, que por sua vez desempenha um papel crítico na DA, promovendo a deposição de βA cerebral, além de impulsionar a hiperfosforilação da TAU, resultando em perda de sinapses e apoptose neuronal (CHEN; ZHONG, 2014). Em nosso estudo não foi observada alteração significativa no córtex ou no hipocampo, quanto a níveis de espécies reativas de oxigênio. Sabe-se que uma das características marcantes dos modelos animais de DA é a presença do quadro caracterizado como estresse oxidativo, que causa danos cerebrais. Desta forma, podemos sugerir que da mesma forma que a inflamação, o processo de formação dessas espécies reativas tenha ocorrido em outro momento, ou até, juntamente com o processo inflamatório (MOHMMAD ABDUL et al. 2006; ZRAIKA et al. 2009). Em modelos de DA utilizando o βA_{1-42} , pôde se observar, que o estresse oxidativo depende do tempo, aumentando marcadores oxidativos em até 10 dias, e após 20 dias já não é possível observar diferenças em seus níveis no cérebro, embora o desempenho cognitivo se apresente prejudicado, em decorrência do tempo de exposição a estes radicais livres (AZM et al., 2018; JHOO et al., 2004; KARTHICK et al., 2019).

As espécies reativas de oxigênio são as moléculas mais conhecidas, em se falando de radicais livres, porém, há outra molécula proveniente do metabolismo da oxidação de NO, chamada nitrito, que está fortemente associada a geração excessiva de espécies reativas de nitrogênio (MANGIALASCHE et al. 2009; SHARMA et al. 2016). Da mesma forma que as espécies reativas de oxigênio, o nitrito também possui função fisiológica, como promover a

síntese de NO, tendo ação vasodilatadora (MANGIALASCHE et al. 2009). A iNOS pode ser estimulada por algumas interleucinas, no processo de neuroinflamação, formando NO em excesso, que pode combinar-se com O₂- e formar o ONOO-, um potente radical livre, levando ao estresse nitrosativo (IMLAY; LINN, 1988).

Em nosso estudo podemos observar que houve alterações dos níveis desse radical livre, onde em córtex se apresentou aumentado no grupo que recebeu a terapia com UPBI, em relação ao grupo sham. De forma semelhante ocorreu no hipocampo, mostrando aumento dessa molécula no grupo que recebeu tratamento com UPBI, em relação ao grupo que serviu apenas como modelo de DA a partir do βA_{1-42} . O tratamento UPBI diminui os níveis de nitrito. Autores mostraram que a injeção de βA_{1-42} no corpo estriado foi capaz de demonstrar níveis significativamente aumentados na expressão de iNOS em ratos (EDLER; MHATRE-WINTERS; RICHARDSON, 2021).

A carbonilação proteica está intimamente ligada ao estresse oxidativo, sendo este o principal marcador de dano proteico, essas proteínas passam a perder sua função assim que são carboniladas (HENSLEY et al. 1995; SMITH et al. 1991). Quanto maior os níveis de proteínas carboniladas, maiores os níveis de espécies reativas de oxigênio (FEDOROVA et al. 2014; Ma et al. 2018; MANO 2012). Em nosso estudo não se observou diferença significativa entre os grupos no córtex, apenas em hipocampo, apresentando diminuição dos níveis de grupos carbonil no grupo que recebeu a terapia com UPBI. Esse resultado pode sugerir que a terapia utilizada em nosso estudo pode minimizar a carbonilação proteica ou auxiliar como prevenção desse mecanismo celular, atrelado a diminuição de apoptose celular. Em modelos animais de doença utilizando βA_{1-42} , autores puderam demonstrar que o conteúdo de carbonilas significativamente foi maior, em comparação aos animais sham (LEE; CHU; CHIANG, 2021). O βA_{1-42} injetado ICV aumenta os níveis de proteínas carboniladas, bem como enzimas antioxidantes, no hipocampo de ratos (NAVIGATORE FONZO et al., 2021). Em tecido muscular, já foi possível observar diminuição no nível de proteínas carboniladas, após o tratamento com UPBI (SILVEIRA et al., 2010).

Para contrabalancear o níveis de radicais livres as células são capazes de utilizar alguns mecanismos, através de enzimas antioxidantes, sendo elas, as principais moléculas capazes de modular o estresse oxidativo e/ou nitrosativo (CHAKRABARTI et al., 2013). Devido ao benefício que seu mecanismo traz às células, formas de aumentar a capacidade antioxidante por tratamentos não invasivos pode prevenir, ou até tratar, doenças

neurodegenerativas, bem como a DA (BIRNBAUM et al., 2018). Além disso, o desequilíbrio de radicais livres podem levar danos, seguida de neuroinflamação e excitotoxicidade glutamatérgica aumentada, e por último, e talvez o mais importante achado neurocelular, a formação de βA_{1-42} (YU; WU, 2021).

Foi possível observar em nosso estudo, que não houve diferença da atividade ou níveis de enzimas antioxidantes, SOD e GSH, em ambos os tecidos, exceto a atividade da SOD no córtex, onde houve aumento de sua atividade no grupo sham em relação ao grupo que mimetizou a DA, que recebeu ou não tratamento com UPBI. Pode-se sugerir, que assim como a formação de radicais livres, pode ter ocorrido alteração mais significativas em outro momento do experimento, indicando que seria de grande importância avaliar essas enzimas em diferentes fases da experimentação animal. Diferentes autores foram capazes de demonstrar que, em animais injetados com βA_{1-42} , espécies EROs estiveram aumentadas, ao passo que os níveis de GSH também estiveram aumentados, em córtex e hipocampo, indicando que o βA_{1-42} pode, de certa forma, modular o estado redox, através da compensação entre enzimas anti-oxidantes e estresse oxidativo no cérebro de camundongos (CETIN; DINCER, 2007; MORRONI et al., 2016).

Em outros estudos, foi possível observar o aumento de atividade da SOD, utilizando o mesmo modelo de βA_{1-42} , em estágios iniciais da doença de 3 semanas, explicando que a adaptação de estresse oxidativo ocorreu em períodos anteriores (AZM et al. 2018; JHOO et al., 2004). O efeito da Ba_{1-42} inclui a diminuição de atividade da SOD, bem como aumento de marcadores de estresse oxidativo, fato que não foi possível afirmar com certeza em nosso estudo, mas outros autores puderam demonstrar (CARRILLO-MORA et al. 2014; KONTUSH 2001). A SOD teve sua atividade aumentada após a injeção ICV de Ba_{1-42} (AZM et al., 2018). O tratamento com UPBI foi capaz de diminuir a atividade da SOD, nas primeiras aplicações, 3º, 5º e 7º dias, após esse período esses níveis voltaram ao nível basal, bem como outras enzimas antioxidantes, dentre elas a glutathiona, que se comportou de maneira semelhante (KHANBAZI et al., 2020).

O UPBI pode ser uma terapia alternativa que auxilia outras a obterem melhor resultado em terapias já existentes, pois esse método é capaz de abrir transitoriamente a BHE, o que facilita a entrega de moléculas ao cérebro fisiologicamente envelhecido (GÖTZ; RICHTER-STRETTON; CRUZ, 2021). O ultrassom pode ser um método seguro de entrega de moléculas/fármacos, já que não foi capaz de gerar dano tecidual e vascular, ao induzir a abertura da BHE, após 4 semanas (MCDANNOLD et al., 2005). Essa abertura da BHE

também pode estimular respostas inflamatórias benéficas, gerando respostas tanto na astroglia, quanto na microglia, resultando secreção de fatores tróficos e de reparo celular, respectivamente (KOVACSA et al., 2017). Além disso, em outros experimentos foi possível observar possível remoção de βA_{1-42} cerebral através da abertura da BHE utilizando o UPBI (JORDÃO et al., 2010; PARK et al., 2021).

5 CONCLUSÃO

Nosso estudo foi capaz de mostrar que o UPBI é capaz de prevenir, ou reverter, o déficit cognitivo e modular os níveis de BDNF e NGF- β no cérebro do modelo de DA induzida por βA_{1-42} . Esses dois resultados combinados podem sugerir que o UPBI seja uma possível terapia, objetivando a melhora cognitiva de paciente com DA. Porém, no momento avaliado, não foram registradas alterações significativas induzidas pelo modelo βA_{1-42} ou tratamento UPBI em parâmetros oxidativos e inflamatórios, sugerindo que as alterações podem ser dependentes do tempo, característica deste modelo.

O tratamento UPBI crônico revela-se, seguro e induz benefícios aos processos de aprendizagem e memória, indicando o UPBI como uma nova e promissora estratégia adjuvante para o tratamento da DA. Ainda são necessários mais estudo sobre essa tecnologia, para que não haja riscos quando em aplicação clínica em humanos, mas já sabe-se que, em animais, se mostrou indolor e não causou lesões cerebrais ou vasculares significativas. O tempo e intensidade devem variar, isso demonstra que uma possível janela terapêutica do UPBI possa existir. Tendo isso em vista, o maior desafio para tratar pessoas com doenças neurodegenerativas seja comprovar a eficácia e segurança da “dose-resposta”.

Nosso trabalho teve como principal objetivo, avaliar o efeito do UPBI em animais que já mimetizam o modelo de DA a partir do βA_{1-42} , desta forma não podemos afirmar que a terapia pode ter ou não efeitos sobre animais sem a doença. Mostramos então apenas o efeito sobre a doença apresentada, mas mais estudos devem ser realizados para comprovar se há ou não efeito sobre cérebros sadios, bem como uma curva “dose-resposta” de tempo e intensidade do UPBI.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, I.; JHA, S. **Mitochondrial Dysfunction and Alzheimer's Disease: Role of Microglia***Frontiers in Aging Neuroscience*, 2020.
- AKIYAMA, H. et al. **Inflammation and Alzheimer's disease***Neurobiology of Aging*, 2000.
- ALEXANDER, G. C.; EMERSON, S.; KESSELHEIM, A. S. **Evaluation of Aducanumab for Alzheimer Disease: Scientific Evidence and Regulatory Review Involving Efficacy, Safety, and Futility***JAMA - Journal of the American Medical Association*, 2021.
- ALLEN, N. J.; BARRES, B. A. **Neuroscience: Glia - more than just brain glue***Nature*, 2009.
- ANTUNES, M.; BIALA, G. **The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications***Cognitive Processing*, 2012.
- AOYAMA, K.; NAKAKI, T. **Impaired glutathione synthesis in neurodegeneration***International Journal of Molecular Sciences*, 2013.
- ARAKI, T.; IKEGAYA, Y.; KOYAMA, R. **The effects of microglia- and astrocyte-derived factors on neurogenesis in health and disease***European Journal of Neuroscience*, 2021.
- ARANCIBIA, S. et al. Protective effect of BDNF against beta-amyloid induced neurotoxicity in vitro and in vivo in rats. *Neurobiology of Disease*, v. 31, n. 3, p. 316–326, 2008.
- ARUOMA, O. I. et al. **Free radicals, antioxidants and diabetes: Embryopathy, retinopathy, neuropathy, nephropathy and cardiovascular complications***Neuroembryology and Aging*, 2007.
- ATHAR, T.; AL BALUSHI, K.; KHAN, S. A. Recent advances on drug development and emerging therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Molecular Biology Reports*, v. 48, n. 7, p. 5629–5645, 28 jul. 2021.
- ATRI, A. **The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management***Medical Clinics of North America*, 2019.
- AUGUSTYNIAK, E. et al. Validation of protein carbonyl measurement: A multi-centre study. *Redox Biology*, 2015.
- AVGERINOS, K. I.; FERRUCCI, L.; KAPOGIANNIS, D. **Effects of monoclonal antibodies against amyloid- β on clinical and biomarker outcomes and adverse event risks: A systematic review and meta-analysis of phase III RCTs in Alzheimer's disease***Ageing Research Reviews*, 2021.
- 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.

BAEK, H. et al. **A neuroprotective brain stimulation for vulnerable cerebellar Purkinje cell after ischemic stroke: A study with low-intensity focused ultrasound**. Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS. **Anais...**2018

BAILEY, D. M. et al. Exaggerated systemic oxidative-inflammatory-nitrosative stress in chronic mountain sickness is associated with cognitive decline and depression. **Journal of Physiology**, 2019.

BALENDRA, V.; SINGH, S. K. **Therapeutic potential of astaxanthin and superoxide dismutase in Alzheimer's disease****Open Biology**, 2021.

BAMBERGER, M. E. et al. A cell surface receptor complex for fibrillar β -amyloid mediates microglial activation. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 7, p. 2665–2674, 2003.

BENTON, D. Neurodevelopment and neurodegeneration: Are there critical stages for nutritional intervention? **Nutrition Reviews**, 2010.

BERCHTOLD, N. C.; COTMAN, C. W. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. **Neurobiology of Aging**, v. 19, n. 3, p. 173–189, 1998.

BIANCHETTI, A. et al. Clinical Presentation of COVID19 in Dementia Patients. **Journal of Nutrition, Health and Aging**, v. 24, n. 6, p. 560–562, 2020.

BIRNBAUM, J. H. et al. Oxidative stress and altered mitochondrial protein expression in the absence of amyloid- β and tau pathology in iPSC-derived neurons from sporadic Alzheimer's disease patients. **Stem Cell Research**, 2018.

BISWAS, M. S.; MANO, J. **Lipid Peroxide-Derived Reactive Carbonyl Species as Mediators of Oxidative Stress and Signaling****Frontiers in Plant Science**, 2021.

BLACKMORE, D. G. et al. Low-intensity ultrasound restores long-term potentiation and memory in senescent mice through pleiotropic mechanisms including NMDAR signaling. **Molecular Psychiatry**, v. 26, n. 11, p. 6975–6991, 2021.

BLACKMORE, J. et al. **Ultrasound Neuromodulation: A Review of Results, Mechanisms and Safety****Ultrasound in Medicine and Biology**, 2019.

BLENNOW, K. et al. **Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease****Alzheimer's and Dementia**, 2015a.

BLENNOW, K. et al. Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 5, p. 297–309, 2015b.

BLOCK, M. L.; ZECCA, L.; HONG, J. S. **Microglia-mediated neurotoxicity: Uncovering the molecular mechanisms****Nature Reviews Neuroscience**, 2007.

BODLES, A. M.; BARGER, S. W. Secreted β -amyloid precursor protein activates microglia via JNK and p38-MAPK. **Neurobiology of Aging**, v. 26, n. 1, p. 9–16, 2005.

BRIGGS, R.; KENNELLY, S. P.; O'NEILL, D. Drug treatments in Alzheimer's disease. **Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London**, 2016.

BURGESS, A. et al. Alzheimer disease in a mouse model: Mr imaging-guided focused ultrasound targeted to the hippocampus opens the blood-brain barrier and improves pathologic abnormalities and behavior. **Radiology**, v. 273, n. 3, p. 736–745, 2014.

BUTTERFIELD, D. A.; BOYD-KIMBALL, D. Oxidative Stress, Amyloid- β Peptide, and Altered Key Molecular Pathways in the Pathogenesis and Progression of Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 62, n. 3, p. 1345–1367, 13 mar. 2018.

BYSTRITSKY, A.; KORB, A. S. **A Review of Low-Intensity Transcranial Focused Ultrasound for Clinical Applications** *Current Behavioral Neuroscience Reports*, 2015.

CARRILLO-MORA, P.; LUNA, R.; COLÍN-BARENQUE, L. Amyloid beta: Multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2014.

CETIN, F.; DINCER, S. **The effect of intrahippocampal beta amyloid (1-42) peptide injection on oxidant and antioxidant status in rat brain.** *Annals of the New York Academy of Sciences. Anais...*2007

CHAE, S. Y. et al. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. **Biomaterials**, 2004.

CHAKRABARTI, S. et al. Oxidative Stress and Amyloid Beta Toxicity in Alzheimer's Disease: Intervention in a Complex Relationship by Antioxidants. **Current Medicinal Chemistry**, 2013.

CHANG, J. W. et al. Ultrasound Stimulation Suppresses LPS-Induced Proinflammatory Responses by Regulating NF- κ B and CREB Activation in Microglial Cells. **Cerebral Cortex**, 2020.

CHEN, C. M. et al. Preventive Effect of Low Intensity Pulsed Ultrasound against Experimental Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury via Apoptosis Reduction and Brain-derived Neurotrophic Factor Induction. **Scientific Reports**, 2018.

CHEN, G. F. et al. **Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development** *Acta Pharmacologica Sinica*, 2017.

CHEN, J. J. et al. Altered central and blood glutathione in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis. **Alzheimer's Research and Therapy**, v. 14, n. 1, 2022.

CHEN, T. T.; LAN, T. H.; YANG, F. Y. Low-intensity pulsed ultrasound attenuates lps-induced neuroinflammation and memory impairment by modulation of tlr4/nf- κ b signaling and creb/bdnf expression. **Cerebral Cortex**, 2019.

CHEN, Z.; ZHONG, C. **Oxidative stress in Alzheimer's disease***Neuroscience Bulletin*, 2014.

CHIANG, M. C. et al. Nanogold Neuroprotection in Human Neural Stem Cells Against Amyloid-beta-induced Mitochondrial Dysfunction. **Neuroscience**, 2020.

CHOI, B. R. et al. Increased expression of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 46, n. 2, 2014.

COMAN, H.; NEMEŞ, B. **New Therapeutic Targets in Alzheimer's Disease***International Journal of Gerontology*, 2017.

COSTA, R. O. et al. Endoplasmic reticulum stress occurs downstream of GluN2B subunit of N-methyl-d-aspartate receptor in mature hippocampal cultures treated with amyloid- β oligomers. **Aging Cell**, v. 11, n. 5, p. 823–833, 2012.

CRISTIANO, C. et al. Neutralization of IL-17 rescues amyloid- β -induced neuroinflammation and memory impairment. **British Journal of Pharmacology**, 2019.

DA SILVA JUNIOR, E. M. et al. Modulating effect of low intensity pulsed ultrasound on the phenotype of inflammatory cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2017.

DALECKI, D. **Mechanical bioeffects of ultrasound***Annual Review of Biomedical Engineering*, 2004.

DELRIEU, J. et al. "Clinical trials in Alzheimer's disease": Immunotherapy approaches*Journal of Neurochemistry*, 2012.

DHAPOLA, R. et al. **Recent advances in molecular pathways and therapeutic implications targeting neuroinflammation for Alzheimer's disease***Inflammopharmacology*, 2021.

DONG, J.; SULIK, K. K.; CHEN, S. YU. The role of NOX enzymes in ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryos. **Toxicology Letters**, 2010.

DOS SANTOS TRAMONTIN, N. et al. Gold Nanoparticles Treatment Reverses Brain Damage in Alzheimer's Disease Model. **Molecular Neurobiology**, 2020.

EDELMAN, B. J. et al. **Systems Neuroengineering: Understanding and Interacting with the Brain***Engineering*, 2015.

EDLER, M. K.; MHATRE-WINTERS, I.; RICHARDSON, J. R. **Microglia in aging and Alzheimer's disease: A comparative species review***Cells*, 2021.

ERATNE, D. et al. Alzheimer's disease: clinical update on epidemiology, pathophysiology and diagnosis. **Australasian Psychiatry**, v. 26, n. 4, p. 347–357, 2018.

FANG, E. F. et al. Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. **Nature Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 401–412, 2019.

FEDOROVA, M.; BOLLINENI, R. C.; HOFFMANN, R. **Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies** *Mass Spectrometry Reviews*, 2014.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. **Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis** *Molecular Aspects of Medicine*, 2009.

FRANCIS, P. T. **Glutamatergic approaches to the treatment of cognitive and behavioural symptoms of Alzheimer's disease**. *Neurodegenerative Diseases. Anais...*2008

GARCEZ, M. L. et al. 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. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 77, p. 23–31, 2017.

GARCEZ, M. L. et al. The Involvement of NLRP3 on the Effects of Minocycline in an AD-Like Pathology Induced by β -Amyloid Oligomers Administered to Mice. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 4, p. 2606–2617, 2019.

GARCÍA-MORALES, V. et al. **Current understanding of the physiopathology, diagnosis and therapeutic approach to alzheimer's disease** *Biomedicines*, 2021.

GHOSH, P. et al. **Cellular and molecular influencers of neuroinflammation in Alzheimer's disease: Recent concepts & roles** *Neurochemistry International*, 2021.

GÖTZ, J.; RICHTER-STRETTON, G.; CRUZ, E. Therapeutic ultrasound as a treatment modality for physiological and pathological ageing including alzheimer's disease. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 7, 2021.

GUO, T. et al. Pulsed transcranial ultrasound stimulation immediately after the ischemic brain injury is neuroprotective. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, 2015.

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

HAMPEL, H. et al. **The β -Secretase BACE1 in Alzheimer's Disease** *Biological Psychiatry*, 2021.

HENEKA, M. T.; RODRÍGUEZ, J. J.; VERKHRATSKY, A. **Neuroglia in neurodegeneration** *Brain Research Reviews*, 2010.

HENSLEY, K. et al. Brain Regional Correspondence Between Alzheimer's Disease

Histopathology and Biomarkers of Protein Oxidation. **Journal of Neurochemistry**, 1995.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, 1976.

HUANG, S. L. et al. Protective effect of low-intensity pulsed ultrasound on memory impairment and brain damage in a rat model of vascular dementia. **Radiology**, 2017.

IMLAY, J. A.; LINN, S. DNA damage and oxygen radical toxicity. **Science**, v. 240, n. 4857, p. 1302–1309, 1988.

ITTNER, L.; GÖTZ, J. Amyloid-beta and tau—a toxic pas de deux in Alzheimer’s disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, p. 67–72, 201AD.

IULITA, M. F. et al. Nerve growth factor metabolic dysfunction in down’s syndrome brains. **Brain**, 2014.

IULITA, M. F. et al. Differential deregulation of NGF and BDNF neurotrophins in a transgenic rat model of Alzheimer’s disease. **Neurobiology of Disease**, 2017.

IWATA, N. et al. Identification of the major A β 1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: Suppression leads to biochemical and pathological deposition. **Nature Medicine**, v. 6, n. 2, p. 143–150, 2000.

JACK, C. R. et al. **NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer’s disease** *Alzheimer’s and Dementia*, 2018.

JÄGER, S. et al. α -secretase mediated conversion of the amyloid precursor protein derived membrane stub C99 to C83 limits A β generation. **Journal of Neurochemistry**, v. 111, n. 6, p. 1369–1382, 2009.

JANSEN, W. J. et al. Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: A meta-analysis. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 313, n. 19, p. 1924–1938, 2015.

JHOO, J. H. et al. β -Amyloid (1-42)-induced learning and memory deficits in mice: Involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex. **Behavioural Brain Research**, 2004.

JIANG, X. et al. **A Review of Low-Intensity Pulsed Ultrasound for Therapeutic Applications** *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2019.

JOHNS, L. D. **Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: The frequency resonance hypothesis** *Journal of Athletic Training*, 2002.

JOHNSON, M. D. et al. **Neuromodulation for brain disorders: Challenges and opportunities** *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2013.

JORDÃO, J. F. et al. Antibodies targeted to the brain with image-guided focused ultrasound

reduces amyloid- β plaque load in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, 2010.

KANSANEN, E.; JYRKÄNEN, H. K.; LEVONEN, A. L. **Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids** *Free Radical Biology and Medicine*, 2012.

KARTHICK, C. et al. Time-dependent effect of oligomeric amyloid- β (1–42)-induced hippocampal neurodegeneration in rat model of Alzheimer's disease. **Neurological Research**, 2019.

KHAN, N.; SMITH, M. Neurotrophins and Neuropathic Pain: Role in Pathobiology. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 10657–10688, 9 jun. 2015.

KHANBAZI, M. H. et al. The effects of therapeutic ultrasound waves on testicular tissue, echogenicity, semen quality, oxidative stress, and acute-phase proteins in dogs. **Theriogenology**, v. 153, p. 39–47, 2020.

KHEMKA, V. K. et al. Raised serum proinflammatory cytokines in Alzheimer's disease with depression. **Aging and Disease**, v. 5, n. 3, p. 170–176, 2014.

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

KIM, D. K.; MOOK-JUNG, I. **The role of cell type-specific mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease** *BMB Reports*, 2019.

KIM, T. et al. Human LirB2 is a β -amyloid receptor and its murine homolog PirB regulates synaptic plasticity in an Alzheimer's model. **Science**, v. 341, n. 6152, p. 1399–1404, 2013.

KLEIN, W. L.; KRAFFT, G. A.; FINCH, C. E. **Targeting small A β oligomers: The solution to an Alzheimer's disease conundrum?** *Trends in Neurosciences*, 2001.

KNAPSKOG, A. B. et al. Alzheimers sykdom – diagnostikk og behandling. **Tidsskrift for den Norske Laegeforening**, v. 141, n. 7, 2021.

KOELLHOFFER, E. C.; MCCULLOUGH, L. D.; RITZEL, R. M. **Old maids: Aging and its impact on microglia function** *International Journal of Molecular Sciences*, 2017.

KONTUSH, A. Amyloid- β : An antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease. **Free Radical Biology and Medicine**, 2001.

KOUHI, A. et al. **Brain disposition of antibody-based therapeutics: Dogma, approaches and perspectives** *International Journal of Molecular Sciences*, 2021.

KOVACS, G. G. Concepts and classification of neurodegenerative diseases. In: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l: s.n.]. v. 145p. 301–307.

KOVACS, G. G.; BOTOND, G.; BUDKA, H. **Protein coding of neurodegenerative dementias: The neuropathological basis of biomarker diagnostics** *Acta Neuropathologica*, 2010.

KOVACSA, Z. I. et al. Disrupting the blood-brain barrier by focused ultrasound induces sterile inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 1, p. E75–E84, 2017.

KRAMES, E. S. et al. **Chapter 1. What Is Neuromodulation?** [s.l: s.n.]. v. 1

KROPF, E.; FAHNESTOCK, M. **Effects of reactive oxygen and nitrogen species on trka expression and signalling: Implications for prongf in aging and alzheimer's disease** *Cells*, 2021.

KURUTAS, E. B. **The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: Current state** *Nutrition Journal*, 2016.

LAURSEN, S. E.; BELKNAP, J. K. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. **Journal of Pharmacological Methods**, 1986.

LEBEL, C. P.; BONDY, S. C. Sensitive and rapid quantitation of oxygen reactive species formation in rat synaptosomes. **Neurochemistry International**, 1990.

LEE, K. T.; CHU, C. Y.; CHIANG, S. S. Ameliorating effect on a β -induced alzheimer's mice by litsea cubeba person powder. **Molecules**, v. 26, n. 18, 2021.

LEGON, W. et al. Transcranial focused ultrasound modulates the activity of primary somatosensory cortex in humans. **Nature Neuroscience**, 2014.

LEINENGA, G.; KOH, W. K.; GÖTZ, J. A comparative study of the effects of Aducanumab and scanning ultrasound on amyloid plaques and behavior in the APP23 mouse model of Alzheimer disease. **Alzheimer's Research and Therapy**, v. 13, n. 1, 2021.

LIN, G. et al. **Effects and mechanisms of low-intensity pulsed ultrasound for chronic prostatitis and chronic pelvic pain syndrome** *International Journal of Molecular Sciences*, 2016.

LIN, W. T. et al. Protective effects of low-intensity pulsed ultrasound on aluminum-induced cerebral damage in Alzheimer's disease rat model. **Scientific Reports**, 2015.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, 1951.

LUKIW, W. J. et al. **Biomarkers for alzheimer's disease (Ad) and the application of precision medicine** *Journal of Personalized Medicine*, 2020.

LYNCH, M. A. **Long-Term Potentiation and Memory** *Physiological Reviews*, 2004.

MA, H. et al. Evaluation of polyphenol anthocyanin-enriched extracts of blackberry, black

raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry for free radical scavenging, reactive carbonyl species trapping, anti-glycation, anti- β -amyloid aggregation, and mic. **International Journal of Molecular Sciences**, 2018.

MANGIALASCHE, F. et al. **Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment** *Ageing Research Reviews*, 2009.

MANO, J. Reactive carbonyl species: Their production from lipid peroxides, action in environmental stress, and the detoxification mechanism. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2012.

MARCUS, D. L. et al. Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. **Experimental Neurology**, v. 150, n. 1, p. 40–44, 1998.

MARÍN-TEVA, J. L. et al. **Microglia and neuronal cell death** *Neuron Glia Biology*, 2012.

MCDANNOLD, N. et al. MRI-guided targeted blood-brain barrier disruption with focused ultrasound: Histological findings in rabbits. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 31, n. 11, p. 1527–1537, 2005.

MERAZ-RÍOS, M. A. et al. **Early onset Alzheimer's disease and oxidative stress** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014.

MINOSHIMA, S. et al. Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease. **Annals of Neurology**, v. 42, n. 1, p. 85–94, 1997.

MITRA, S.; BEHBAHANI, H.; ERIKSDOTTER, M. **Innovative therapy for Alzheimer's disease-with focus on biodelivery of NGF** *Frontiers in Neuroscience*, 2019.

MOHMMAD ABDUL, H. et al. Mutations in amyloid precursor protein and presenilin-1 genes increase the basal oxidative stress in murine neuronal cells and lead to increased sensitivity to oxidative stress mediated by amyloid β -peptide (1-42), H₂O₂ and kainic acid: Implications for A. **Journal of Neurochemistry**, 2006.

MORRONI, F. et al. Early effects of A β 1-42 oligomers injection in mice: Involvement of PI3K/Akt/GSK3 and MAPK/ERK1/2 pathways. **Behavioural Brain Research**, v. 314, p. 106–115, 2016.

MURER, M. G. et al. An immunohistochemical study of the distribution of brain-derived neurotrophic factor in the adult human brain, with particular reference to Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 88, n. 4, p. 1015–1032, 1999.

NAVIGATORE FONZO, L. et al. An intracerebroventricular injection of amyloid-beta peptide (1–42) aggregates modifies daily temporal organization of clock factors expression, protein carbonyls and antioxidant enzymes in the rat hippocampus. **Brain Research**, v. 1767, 2021.

NIXON, R. A. **Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease** *Journal of Cell*

Science, 2007.

NOTTURNO, F. et al. Neuroprotective effect of cathodal transcranial direct current stimulation in a rat stroke model. **Journal of the Neurological Sciences**, 2014.

OLSSON, F. et al. Characterization of intermediate steps in amyloid beta (A β) production under near-native conditions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 3, p. 1540–1550, 2014.

ORGANIZATION, W. H. **WHO**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>>. Acesso em: 1 abr. 2022.

OYELEKE, M. B.; OWOYELE, B. V. Saponins and flavonoids from *Bacopa floribunda* plant extract exhibit antioxidant and anti-inflammatory effects on amyloid beta 1-42-induced Alzheimer's disease in BALB/c mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 288, 2022.

PADURARIU, M. et al. Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 469, n. 1, p. 6–10, 2010.

PANDIT, R.; LEINENGA, G.; GÖTZ, J. Repeated ultrasound treatment of tau transgenic mice clears neuronal tau by autophagy and improves behavioral functions. **Theranostics**, v. 9, n. 13, p. 3754–3767, 2019.

PARK, H.; POO, M. M. **Neurotrophin regulation of neural circuit development and function** *Nature Reviews Neuroscience*, 2013.

PARK, S. H. et al. Extensive frontal focused ultrasound mediated blood–brain barrier opening for the treatment of Alzheimer's disease: a proof-of-concept study. **Translational Neurodegeneration**, v. 10, n. 1, 2021.

PEREIRA, C. F. et al. **Is Alzheimer's disease an inflammasomopathy?** *Ageing Research Reviews*, 2019.

PERRY, V. H.; HOLMES, C. **Microglial priming in neurodegenerative disease** *Nature Reviews Neurology*, 2014.

PHILLIPS, H. S. et al. BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. **Neuron**, 1991.

QIN, H. C.; LUO, Z. W.; ZHU, Y. L. Physical energy-based ultrasound shifts M1 macrophage differentiation towards M2 state. **World Journal of Stem Cells**, v. 14, n. 2, p. 214–218, 2022.

RADI, E. et al. **Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases**. *Journal of Alzheimer's Disease*. **Anais...**2014

RAMÍREZ, E. et al. Neuroinflammation induced by the peptide amyloid- β (25–35) increase the presence of galectin-3 in astrocytes and microglia and impairs spatial memory.

Neuropeptides, 2019.

REDDY, P. H.; BEAL, M. F. **Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease?** *Brain Research Reviews*, 2005.

REIMAN, E. M. Attack on amyloid- β protein. *Nature*, v. 537, n. 7618, p. 36–37, 2016.

REPACHOLI, M. H. et al. **Ultrasound: Medical Applications, Biological Effects, and Hazard Potential**. [s.l.: s.n.]. v. 16

SAHARAN, S.; MANDAL, P. K. **The emerging role of glutathione in alzheimer's disease** *Journal of Alzheimer's Disease*, 2014.

SALMAN, K. A.; ASHRAF, S. Reactive oxygen species: A link between chronic inflammation and cancer. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, v. 22, n. 2, p. 42–49, 2015.

SASTRE, M.; KLOCKGETHER, T.; HENEKA, M. T. **Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: Molecular mechanisms**. *International Journal of Developmental Neuroscience*. Anais...2006

SAUER, H.; WARTENBERG, M.; HESCHELER, J. **Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation** *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2001.

SCHELTENS, P. et al. Atrophy of medial temporal lobes on MRI in “probable” Alzheimer's disease and normal ageing: diagnostic value and neuropsychological correlates. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, v. 55, n. 10, p. 967–972, 1992.

SCHELTENS, P. et al. **Alzheimer's disease** *The Lancet*, 2016.

SCHNEIDER, L. S. et al. Low-dose ladostigil for mild cognitive impairment: A phase 2 placebo-controlled clinical trial. *Neurology*, v. 93, n. 15, p. e1474–e1484, 2019.

SCHWAB, M. E. et al. Nerve growth factor (NGF) in the rat CNS: Absence of specific retrograde axonal transport and tyrosine hydroxylase induction in locus coeruleus and substantia nigra. *Brain Research*, v. 168, n. 3, p. 473–483, 1979.

SEIFRIED, H. E. et al. **A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species** *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2007.

SHABAB, T. et al. **Neuroinflammation pathways: a general review** *International Journal of Neuroscience*, 2017.

SHANKAR, G. M. et al. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid- β protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *Journal of Neuroscience*, v. 27, n. 11, p. 2866–2875, 2007.

SHARMA, S. et al. Alzheimer's disease like pathology induced six weeks after aggregated amyloid-beta injection in rats: increased oxidative stress and impaired long-term memory with anxiety-like behavior. **Neurological Research**, v. 38, n. 9, p. 838–850, 1 set. 2016.

SHARMA, S. et al. Carbenoxolone Reverses the Amyloid Beta 1–42 Oligomer–Induced Oxidative Damage and Anxiety-Related Behavior in Rats. **Neurotoxicity Research**, 2019.

SHEN, Y. et al. Ultrasound with microbubbles improves memory, ameliorates pathology and modulates hippocampal proteomic changes in a triple transgenic mouse model of alzheimer's disease. **Theranostics**, v. 10, n. 25, p. 11794–11819, 2020.

SHIN, J. et al. Focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening improves adult hippocampal neurogenesis and cognitive function in a cholinergic degeneration dementia rat model. **Alzheimer's Research and Therapy**, 2019.

SIEMERS, E. et al. Safety, tolerability, and changes in amyloid β concentrations after administration of a γ -secretase inhibitor in volunteers. **Clinical Neuropharmacology**, v. 28, n. 3, p. 126–132, 2005.

SILVEIRA, P. C. L. et al. Effects of Therapeutic Pulsed Ultrasound and Dimethylsulfoxide (DMSO) Phonophoresis on Parameters of Oxidative Stress in Traumatized Muscle. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 36, n. 1, p. 44–50, 2010.

SIMON, K. U. et al. Intranasal insulin treatment modulates the neurotropic, inflammatory, and oxidant mechanisms in the cortex and hippocampus in a low-grade inflammation model. **Peptides**, 2020.

SMITH, C. D. et al. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1991.

SU, W. S. et al. Low-intensity pulsed ultrasound improves behavioral and histological outcomes after experimental traumatic brain injury. **Scientific Reports**, 2017a.

SU, W. S. et al. Transcranial ultrasound stimulation promotes brain-derived neurotrophic factor and reduces apoptosis in a mouse model of traumatic brain injury. **Brain Stimulation**, v. 10, n. 6, p. 1032–1041, 2017b.

SUN, Z. T. et al. **Application of Antibody Fragments Against A β With Emphasis on Combined Application With Nanoparticles in Alzheimer's Disease** *Frontiers in Pharmacology*, 2021.

SWERDLOW, R. H.; BURNS, J. M.; KHAN, S. M. **The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: Progress and perspectives** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 2014.

TAYLOR, J. M.; MAIN, B. S.; CRACK, P. J. Neuroinflammation and oxidative stress: Co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 5, p. 803–819, abr. 2013.

TYLER, W. J.; LANI, S. W.; HWANG, G. M. **Ultrasonic modulation of neural circuit activity***Current Opinion in Neurobiology*, 2018.

TYLER, W. J.; TUFAIL, Y.; PATI, S. **Pain: Noninvasive functional neurosurgery using ultrasound***Nature Reviews Neurology*, 2010.

UDDIN, M. S. et al. **Pharmacological approaches to mitigate neuroinflammation in Alzheimer's disease***International Immunopharmacology*, 2020.

VASSAR, R. **BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease***Alzheimer's Research and Therapy*, 2014.

VINCENTI, S. et al. **Biocatalytic synthesis of natural green leaf volatiles using the lipoxygenase metabolic pathway***Catalysts*, 2019.

WAN, H. L. et al. STAT3 ameliorates cognitive deficits via regulation of NMDAR expression in an Alzheimer's disease animal model. *Theranostics*, v. 11, n. 11, p. 5511–5524, 2021.

WANG, P. et al. **Brain modulatory effects by low-intensity Transcranial Ultrasound Stimulation (TUS): A systematic review on both animal and human studies***Frontiers in Neuroscience*, 2019.

WELLER, J.; BUDSON, A. **Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment***F1000Research*, 2018.

WEYDERT, C. J.; CULLEN, J. J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols*, v. 5, n. 1, p. 51–66, 17 jan. 2010.

WHO methods and data sources for life tables 1990-2019. Disponível em: <<https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-life-expectancy-and-healthy-life-expectancy>>. Acesso em: 1 abr. 2021.

WU, Z. et al. Neurotrophic signaling deficiency exacerbates environmental risks for Alzheimer's disease pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 118, n. 25, 2021.

XU, H. et al. Environmental enrichment potently prevents microglia-mediated neuroinflammation by human amyloid β -protein oligomers. *Journal of Neuroscience*, v. 36, n. 35, p. 9041–9056, 2016.

XU, H. et al. Enriched environment enhances β -adrenergic signaling to prevent microglia inflammation by amyloid- β . *EMBO Molecular Medicine*, v. 10, n. 9, 2018.

YANG, F. et al. Roles of astrocytes and microglia in seizure-induced aberrant neurogenesis in the hippocampus of adult rats. *Journal of Neuroscience Research*, v. 88, n. 3, p. 519–529, 2010.

YANG, F. Y. et al. Enhancement of neurotrophic factors in astrocyte for neuroprotective effects in brain disorders using low-intensity pulsed ultrasound stimulation. **Brain Stimulation**, 2015.

YANG, T. et al. Large soluble oligomers of amyloid β -protein from alzheimer brain are far less neuroactive than the smaller oligomers to which they dissociate. **Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 1, p. 152–163, 2017.

YIANNOPOULOU, K. G.; PAPAGEORGIOU, S. G. **Current and future treatments for Alzheimer's disease** *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 2013.

YU, H.; WU, J. **Amyloid- β : A double agent in Alzheimer's disease?** *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2021.

ZHANG, H. et al. Review interaction between $a\beta$ and tau in the pathogenesis of alzheimer's disease. **International Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 9, p. 2181–2192, 2021.

ZHANG, X. et al. **The γ -secretase complex: From structure to function** *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2014.

ZHANG, X. et al. Inhibitory Effect of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on the Expression of Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Factors in U937 Cells: **Journal of Ultrasound in Medicine**, 2017.

ZHENG, H.; KOO, E. H. **Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein** *Molecular Neurodegeneration*, 2011.

ZHENG, T. et al. Neuroprotective Effect of Low-Intensity Transcranial Ultrasound Stimulation in Moderate Traumatic Brain Injury Rats. **Frontiers in Neuroscience**, 2020.

ZHOU, R. et al. **PET Imaging of Neuroinflammation in Alzheimer's Disease** *Frontiers in Immunology*, 2021.

ZORTÉA, D. et al. Effects of Phonophoresis and Gold Nanoparticles in Experimental Model of Muscle Overuse: Role of Oxidative Stress. **Ultrasound in Medicine and Biology**, 2015.

ZRAIKA, S. et al. Oxidative stress is induced by islet amyloid formation and time-dependently mediates amyloid-induced beta cell apoptosis. **Diabetologia**, 2009.

ZUSSY, C. et al. Alzheimer's Disease Related Markers, Cellular Toxicity and Behavioral Deficits Induced Six Weeks after Oligomeric Amyloid- β Peptide Injection in Rats. **PLoS ONE**, 2013.