

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

**Pollyana Mendonça de Assis**

**Análogo do resveratrol, inibidor da acetilcolinesterase *in vitro*, suprime o déficit cognitivo induzido pela escopolamina em camundongos**

**Juiz de Fora**

**2019**

**Pollyana Mendonça de Assis**

**Análogo do resveratrol, inibidor da acetilcolinesterase *in vitro*, suprime o déficit cognitivo induzido pela escopolamina em camundongos**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito à obtenção do grau de Mestre em Saúde.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Nádia Rezende Barbosa Raposo

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Cypriano Dutra

**Juiz de Fora**

**2019**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Assis, Pollyana Mendonça de.

Análogo do resveratrol, inibidor da acetilcolinesterase in vitro, suprime o déficit cognitivo induzido pela escopolamina em camundongos / Pollyana Mendonça de Assis. -- 2019.

101 f. : il.

Orientadora: Nádia Rezende Barbosa Raposo

Coorientador: Rafael Cypriano Dutra

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2019.

1. Resveratrol. 2. Doença de Alzheimer. 3. Acetilcolinesterase. 4. Déficit cognitivo. 5. Escopolamina. I. Raposo, Nádia Rezende Barbosa, orient. II. Dutra, Rafael Cypriano, coorient. III. Título.

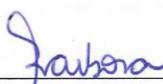
**Pollyana Mendonça de Assis**

**Análogo do resveratrol, inibidor da acetilcolinesterase in vitro, suprime o déficit cognitivo induzido pela escopolamina em camundongos**

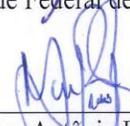
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Saúde. Área de Concentração: Saúde Brasileira

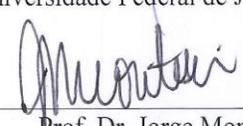
Aprovada em 03 / 12 / 2019

BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo – Orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rafael Cypriano Dutra - Coorientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão  
Universidade Federal de Juiz de Fora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Jorge Montessi  
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora – SUPREMA

PROF. DR. ABELANIR ANTONIO BARROSO



*À tia Lúcia, que mantém o nosso amor vivo naquilo  
que ainda resta da sua memória.*

## AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho só foi possível porque eu recebi, ao longo destes dois últimos anos, o apoio e a ajuda de muitas pessoas queridas. Minha mais sincera gratidão a todos vocês, em especial:

À professora orientadora Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo, por ter aberto as portas do NUPICS para mim sem mesmo me conhecer e ter me dado a oportunidade de aprender com ela, diariamente, a ser uma pessoa e profissional melhor. Nádia, você é uma grande inspiração para mim e serei eternamente grata ao universo por ter me dado a chance de iniciar o meu caminho profissional sob o seu olhar.

Ao professor co-orientador Dr. Rafael Cypriano Dutra, por ter me apresentado ao mundo da neurociência com tanta paciência e por ter aceito o convite de me co-orientar neste trabalho. Agradeço também pela receptividade com a qual me recebeu em seu laboratório.

Ao professor Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão, pelos ensinamentos, pelo convívio e por sempre ter uma palavra acolhedora e inspiradora. Foi na aula dele que o meu olhar pela Farmácia brilhou de verdade pela primeira vez.

Ao professor Dr. Adilson David da Silva, que colaborou com a etapa de síntese molecular.

Ao Laboratório de Autoimunidade e Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, na figura do professor Dr. Rafael Cypriano Dutra, pela receptividade e apoio na execução da etapa *in vivo* deste trabalho. Agradeço, em especial, à Jaíne, por me ensinar, acompanhar e estar sempre disponível para sanar minhas dúvidas. Este trabalho não seria possível sem ela.

Aos amigos do NUPICS que tive/tenho o prazer do convívio diário: José, Hanny, Débora, Nathália, Marcela, Molise, Paulo, José Márcio. Agradeço, em especial, à amiga Laura, minha grande fonte de inspiração.

Aos amigos Alexandre e Lorena, que pacientemente me acolheram na cultura celular, me ensinaram e dividiram comigo muitas horas agradáveis de trabalho e aprendizado.

À minha família, em especial à minha mãe Enedina e ao meu pai Carlos, por todo amor e apoio incondicional neste caminho que eu persigo insistentemente, que é o da educação.

Ao Alex, pelos anos de incentivo e por ser sempre um ombro amigo.

À Tayná, amiga de todas as horas, por acreditar mais do que eu no meu potencial.

Finalmente, agradeço a Deus e a todas as forças do universo que conspiram para o bem, que me fazem acreditar sempre no amor e no respeito ao próximo como as únicas ferramentas eficazes para a transformação social.

“É preciso ter esperança, mas ter esperança do verbo esperar; porque tem gente que tem esperança do verbo esperar. E esperança do verbo esperar não é esperança, é espera. Esperançar é se levantar, esperançar é ir atrás, esperançar é construir, esperançar é não desistir! Esperançar é levar adiante, esperançar é juntar-se com outros para fazer de outro modo. ”

Paulo Freire

## RESUMO

O aumento da expectativa média de vida da população é um fenômeno atual. Segundo alguns pesquisadores, a idade é o principal fator de risco que contribui para o aumento da incidência das principais patologias que afetam a faixa etária mais idosa, incluindo a doença de Alzheimer (DA). Estima-se que a DA acometa cerca de 35 milhões de pessoas globalmente a um custo bilionário para os serviços de saúde. Apesar do impacto social e econômico, poucas estratégias farmacológicas estão disponíveis para o manejo desta doença, que é progressiva e incurável. Ao resveratrol (RSV), uma fitoalexina, são atribuídas diversas atividades biológicas, incluindo a neuroproteção. No entanto, sua baixa biodisponibilidade ainda é um fator limitante ao uso clínico deste fitoquímico. Uma série de análogos do RSV foi anteriormente sintetizada e testada quanto as suas ações biológicas. RSVA6 demonstrou tanto *in silico* quanto *in vitro* ser capaz de interagir e inibir a enzima acetilcolinesterase. Para o presente estudo, avaliou-se a capacidade antioxidante de RSVA6 pelo método do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil e, comparado ao RSV, o análogo apresentou ação inferior. Ensaio *in vivo* foram conduzidos a fim de testar a capacidade neuroprotetora de RSVA6 em camundongos induzidos ao déficit cognitivo pela escopolamina (ESC). Os camundongos foram pré-tratados com uma dose única de RSVA6 (100 mg kg<sup>-1</sup>; via oral) ou rivastigmina (1 mg kg<sup>-1</sup>; intraperitoneal), e após um tempo de 60 min, receberam ESC (1 mg kg<sup>-1</sup>; intraperitoneal). RSVA6 preveniu o declínio cognitivo nos animais submetidos aos testes de memória do pellet enterrado, de reconhecimento de objetos e de realocação de objetos. Além disso, o derivado do RSV não exerceu efeito comportamental no experimento no campo aberto e no labirinto em cruz elevado, sugerindo a não-interferência da molécula na atividade motora e no comportamento tipo-ansioso dos animais. Em conjunto, os resultados apontam que RSVA6 exerce efeito neuroprotetor na disfunção cognitiva induzida pela escopolamina e sugerem a molécula como um potencial candidato para o manejo de doenças neurodegenerativas, incluindo a DA.

Palavras-chave: resveratrol, doença de Alzheimer, acetilcolinesterase, déficit cognitivo, escopolamina.

## ABSTRACT

The increase of the global population life expectancy is a current phenomenon. According to some researchers, age is the main risk factor that contributes to a higher incidence of the major pathologies over the elderly group, including Alzheimer's disease (AD). AD is estimated to affect over 35 million people globally at a billion-dollar cost for the health systems. Despite the social and economic impact, few pharmacological strategies are available for the management of this progressive and cureless disease. Resveratrol (RSV), a phytoalexin, is known as having several biological properties, including neuroprotection. However, its low bioavailability is still a limiting factor to the clinical use of this phytochemical. A number of RSV analogs have previously been synthesized and tested for their biological actions. RSVA6 has been shown both *in silico* and *in vitro* to be able to interact and inhibit the acetylcholinesterase enzyme. In this present study, the antioxidant capacity of RSVA6 was evaluated by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine method. Comparing to RSV, the analogue showed inferior action. *In vivo* assays were conducted in order to test the neuroprotective ability of RSVA6 on scopolamine-induced cognitive impairments. Mice were pretreated with a single dose of RSVA6 (100 mg kg<sup>-1</sup>; orally) or rivastigmine (1 mg kg<sup>-1</sup>; intraperitoneally), followed by a 60 min interval before receiving scopolamine (1 mg kg<sup>-1</sup>) intraperitoneally. RSVA6 prevented cognitive decline in the buried pellet, object recognition and object location tasks. In addition, the derivative had no behavioral effect on the open field and elevated plus maze tests, suggesting no interference on the motor activity and anxious-type behavior. Taken together, the results indicate neuroprotective effect of RSVA6 on scopolamine-induced cognitive dysfunction and suggest the molecule as a potential candidate for the treatment of neurodegenerative diseases, including AD.

Key words: Resveratrol, Alzheimer's disease, acetylcholinesterase, cognitive impairment, scopolamine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Evolução esquemática patológica da doença de Alzheimer e seus diferentes estágios.....	22
Figura 2	Representação esquemática da localização e das projeções colinérgicas no sistema nervoso central.....	25
Figura 3	Síntese e degradação da acetilcolina na fenda sináptica.....	26
Figura 4	Origem, mecanismo de formação e toxicidade da placa amiloide.....	28
Figura 5	Formação de emaranhados neurofibrilares a partir da hiperfosforilação da proteína <i>tau</i> , durante o desenvolvimento e progressão da doença de Alzheimer.....	31
Figura 6	Representação esquemática da enzima acetilcolinesterase .....	35
Figura 7	Representação esquemática dos sítios de ligação da enzima acetilcolinesterase.	36
Figura 8	Representação esquemática da hidrólise da acetilcolina que ocorre no sítio ativo da enzima acetilcolinesterase .....	37
Figura 9	Estrutura química da tacrina.....	38
Figura 10	Estrutura química dos inibidores da enzima acetilcolinesterase aprovados para o tratamento da doença de Alzheimer.....	38
Figura 11	Esquema representativo dos tipos de memória.....	42
Figura 12	Estrutura química do esqueleto estilbenoide.....	45
Figura 13	Estruturas químicas do <i>trans</i> -resveratrol e do <i>cis</i> -resveratrol.....	46
Figura 14	Representação esquemática do metabolismo simplificado do resveratrol.....	48
Figura 15	Rota sintética dos derivados aza-estilbenóides do resveratrol.....	53
Figura 16	Delineamento experimental dos ensaios <i>in vivo</i> .....	59
Figura 17	Representação esquemática do animal durante o protocolo de avaliação da memória olfativa avaliada pelo teste do <i>pellet</i> enterrado.....	60
Figura 18	Representação esquemática do protocolo de avaliação da memória de reconhecimento, através do teste de reconhecimento de objeto.....	61
Figura 19	Representação esquemática do animal sob avaliação das atividades exploratória e locomotora no teste do campo aberto.....	62

Figura 20	Representação esquemática da avaliação da memória espacial do animal através do teste de realocação de objeto.....	63
Figura 21	Representação do animal durante o protocolo de avaliação de ansiedade, através do teste do labirinto em cruz elevado.....	63
Figura 22	Estruturas químicas do resveratrol e seus derivados utilizados no estudo de Stivala e colaboradores (2001) .....	72
Figura 23	Representação da estrutura química do <i>trans</i> -resveratrol e do seu análogo RSVA6.....	73
Figura 24	Estruturas químicas do resveratrol e seus principais metabólitos.....	75
Gráfico 1	Atividade antioxidante do resveratrol e de RSVA6 pelo método do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil.....	65
Gráfico 2	Pré-tratamento com RSVA6 preveniu disfunção sensorial olfativa.....	66
Gráfico 3	Efeito do RSVA6 no déficit cognitivo induzido pela escopolamina em camundongos <i>Swiss</i> no teste de reconhecimento de objeto.....	67
Gráfico 4	Avaliação da atividade locomotora dos animais da linhagem C57BL/6, avaliada no teste do campo aberto.....	68
Gráfico 5	Efeito do RSVA6 no déficit cognitivo induzido pela escopolamina em camundongos C57BL/6 no teste de realocação de objeto.....	69
Gráfico 6	Avaliação do perfil de ansiedade de camundongos C57BL/6, através do labirinto em cruz elevado.....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação entre os inibidores da enzima acetilcolinesterase disponíveis no mercado para o tratamento da doença de Alzheimer. ....	40
Tabela 2	Descrição dos modelos animais utilizados na triagem de novas moléculas para a doença de Alzheimer. ....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADAS-Cog	<i>Alzheimer's Disease Assessment Scale</i> (Escala de Avaliação para a Doença de Alzheimer A – cognitiva)
ALT	Alanina transaminase
ANOVA	Análise de Variância
ApoE	Apolipoproteína E
APP	<i>Amyloid precursor protein</i> (Proteína precursora amiloide)
A $\beta$	Proteína $\beta$ -amiloide
BACE	<i><math>\beta</math>-amyloid cleaving enzyme</i> ( $\beta$ -secretase)
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic fator</i> (Fator neurotrófico derivado do cérebro)
BuChE	Butirilcolinesterase
Ca <sup>2+</sup>	Íons cálcio
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
ChAT	Colina-O-acetil-transferase
CHT1	Transportador de colina de alta afinidade
CE <sub>50</sub>	Concentração efetiva que inibe 50%
COX	Ciclooxigenase
DA	Doença de Alzheimer
DBCA	Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EOAD	<i>Early Onset Alzheimer's Disease</i> (Doença de Alzheimer de início precoce)
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio

ESC	Escopolamina
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
FAD	<i>Familial Alzheimer's Disease</i> (Doença de Alzheimer familiar)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FHP	Filamentos helicoidais pareados
FR	Filamentos retos
GLU-RSV	Resveratrol sob a forma glucuronídea
GSK3 $\beta$	Glicogênio sintase quinase 3 $\beta$
H <sup>+</sup>	Próton
H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	Hidroxônio
HMGB1	<i>High Mobility Group Box-1</i> (Grupo de proteínas 1 de alta mobilidade)
i.p.	Intraperitoneal
iAChE	Inibidores de acetilcolinesterase
ID	Índice de discriminação
IL	Interleucina
iNOS	<i>Induceble Nitric Oxide Synthase</i> (Óxido nítrico-sintase induzida)
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> (Proteína de baixa densidade)
LOAD	<i>Late Onset Alzheimer's Disease</i> (Doença de Alzheimer de início tardio)
LTP	<i>Long-term potentiation</i> (Potencial de longa duração)
MMSE	<i>Mini-Mental State Examination</i> (Exame do Estado Mental)
NBM	Núcleo basal de Meynert
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor Kappa B</i> (Fator Nuclear Kappa B)
NMDA	N-metil-D-aspartato
Nrf2	<i>Nuclear factor-like2</i> (Fator nuclear –tipo 2)
–OH	Hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Óxido nítrico
.	OOH    Radical hidroperoxila

P.A.	Para análise
PLA2	<i>Phospholipase A2</i> (Fosfolipase A2)
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
R – C = O	Carbonila
RIVA	Rivastigmina
RSV	Resveratrol
RSVA6	Análogo do resveratrol número 6
RUV	Radiação ultravioleta
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SIRT	Sirtuína
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SUL-RSV	Resveratrol sob a forma sulfatada
TCA	Teste de Campo Aberto
TGI	Trato gastrointestinal
TLR4	<i>Toll like receptor 4</i> (Receptor do tipo Toll 4)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator De Necrose Tumoral)
TRaO	Teste de Realocação de Objeto
TRcO	Teste de Reconhecimento de Objeto
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UGT	Uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase
v.o.	Via oral
VACHT	Transportador vesicular de acetilcolina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
2.1. DOENÇA DE ALZHEIMER .....	20
<b>2.1.1. Aspectos gerais</b> .....	20
<b>2.1.2. Bases moleculares da doença de Alzheimer</b> .....	24
2.1.2.1. <i>Hipótese colinérgica</i> .....	24
2.1.2.2. <i>Hipótese da cascata amiloide</i> .....	27
2.1.2.3. <i>Hipótese da proteína tau</i> .....	30
2.1.2.4. <i>Hipótese da neuroinflamação</i> .....	32
<b>2.1.3. Tratamentos farmacológicos</b> .....	33
2.1.3.1. <i>A enzima acetilcolinesterase</i> .....	34
2.1.3.2. <i>Inibidores da acetilcolinesterase utilizados na DA</i> .....	37
<b>2.1.4. Memória e modelos animais da DA</b> .....	41
2.2. RESVERATROL.....	45
<b>2.2.1. Absorção, metabolismo e biodisponibilidade</b> .....	47
<b>2.2.2. Propriedades biológicas</b> .....	50
2.2.2.1. <i>Ação antioxidante</i> .....	50
2.2.2.2. <i>Ação imunomoduladora</i> .....	51
2.2.2.3. <i>Ação neuroprotetora</i> .....	52
<b>2.2.3. Aza-estilbenos análogos do resveratrol</b> .....	53
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	55
3.1. GERAL .....	55
3.2. ESPECÍFICOS .....	55
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	56
4.1. MOLÉCULA-TESTE: RSVA6 .....	56
4.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	56
4.3. ANIMAIS .....	57
4.4. DESENHO EXPERIMENTAL .....	58
4.5. TESTES COMPORTAMENTAIS E DE MEMÓRIA .....	59

<b>4.5.1. Teste do <i>pellet</i> enterrado.....</b>	<b>59</b>
<b>4.5.2. Teste de reconhecimento de objetos (TRcO) .....</b>	<b>60</b>
<b>4.5.3. Teste do campo aberto (TCA).....</b>	<b>61</b>
<b>4.5.4. Teste de realocação de objetos (TRaO).....</b>	<b>62</b>
<b>4.5.5. Teste do labirinto em cruz elevado (LCE).....</b>	<b>63</b>
<b>4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....</b>	<b>64</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>64</b>
<b>5.1. RSVA6 APRESENTOU AÇÃO ANTIOXIDANTE INFERIOR AO RESVERATROL.....</b>	<b>64</b>
<b>5.2. EFEITO NEUROPROTETOR DO RSVA6 NO MODELO EXPERIMENTAL DE DÉFICIT COGNITIVO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE ESCOPOLAMINA .....</b>	<b>65</b>
<b>5.2.1. Pré-tratamento com RSVA6 preveniu disfunção sensorial olfativa.....</b>	<b>65</b>
<b>5.2.2. Efeito neuroprotetor de RSVA6 na memória de reconhecimento.....</b>	<b>66</b>
<b>5.2.3. RSVA6 não interferiu na atividade locomotora dos animais.....</b>	<b>67</b>
<b>5.2.4. Efeito neuroprotetor do RSVA6 na memória espacial de curto prazo .....</b>	<b>68</b>
<b>5.2.5. RSVA6 não alterou o nível de ansiedade dos animais após a administração da escopolamina .....</b>	<b>69</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....</b>	<b>101</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional é um fenômeno atual, acompanhado pelo aumento da incidência de doenças que comumente afetam a faixa etária mais idosa (FOTIOU *et al.*, 2015). A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa sendo a principal causa de demência entre os idosos. Atualmente, estima-se que cerca de 35 milhões de pessoas ao redor do mundo são acometidas pela DA (WORLD ALZHEIMER REPORT, 2018), representando um impacto econômico de aproximadamente US\$ 818 bilhões (MICHALOWSKY *et al.*, 2019). As projeções indicam que tanto o número de pessoas acometidas pela DA quanto os gastos envolvidos no cuidado desses pacientes tendem a triplicar em 2050 (BARNES *et al.*, 2018). O contexto epidemiológico aponta um cenário atual de processo de inversão da pirâmide etária e o envelhecimento populacional como um dos principais fatores de risco para doenças neurodegenerativas, incluindo a DA.

A DA apresenta-se como uma patologia progressiva e incurável, caracterizada pelo declínio da memória e das funções cognitivas (REITZ; MAYEUX, 2014). Os sinais histopatológicos mais relevantes incluem o acúmulo de placas insolúveis da proteína  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) no meio extracelular e a agregação de emaranhados fibrilares da proteína *tau* hiperfosforilada no interior dos neurônios (SERRANO-POZO *et al.*, 2011; MAGAKI *et al.*, 2018). Outra modificação observada na DA é a diminuição dos níveis do neurotransmissor acetilcolina (ACh) na fenda sináptica, o qual é fundamental nos processos de aprendizado e memória (FOTIOU *et al.*, 2015). Apesar das alterações patológicas e moleculares observadas no curso da doença, pouco se conhece acerca dos processos fisiopatológicos relacionados à gênese e progressão da DA.

Nos últimos anos, algumas teorias surgiram a fim de tentarem preencher essa lacuna do conhecimento científico, incluindo as hipóteses, a saber: colinérgica, da cascata amiloide, da proteína *tau* e da neuroinflamação. A partir dessas hipóteses, pesquisadores buscam por soluções farmacológicas capazes de interferir, de alguma forma, na progressão da DA. A hipótese colinérgica associa o declínio cognitivo à diminuição nos níveis de ACh na fenda sináptica (DU; WANG; GENG, 2018). Três dos quatro medicamentos aprovados para o tratamento sintomático da DA são inibidores da enzima acetilcolinesterase (iAChE; SCHELTENS *et al.*, 2016). No entanto, ao menos metade dos pacientes não responde ao tratamento disponível (KUMAR;

SINGH; EKAVALI, 2015), sendo este o motivo pelo qual a busca por estratégias voltadas para o manejo da DA se faz tão necessária.

O resveratrol (RSV) é um polifenol encontrado em um grande número de vegetais, tais como o amendoim, frutas vermelhas e uvas (MALHOTRA; BATH; ELBARBRY, 2015). Diferentes relatos científicos associam o RSV à prevenção e/ou capacidade de tratamento de distintas doenças. Além da propriedade antioxidante já bem documentada (SALEHI et al., 2018), o polifenol ainda exibe ação anti-inflamatória (YANEZ et al., 2019), neuroprotetora (QI et al., 2019), fotoprotetora (OLIVEIRA et al., 2016), dentre outras. No entanto, a biodisponibilidade do RSV é muito baixa (FRANCO et al., 2012), fato esse que limita a extrapolação dos efeitos observados *in vitro* para os modelos de estudos *in vivo*.

Dentro desta perspectiva e objetivando solucionar o problema da biodisponibilidade do RSV em humanos, diversas estratégias têm sido exploradas nos últimos anos. Um exemplo é a síntese de novos e mais potentes análogos do RSV que possuam melhores propriedades farmacocinéticas e biológicas comparadas à molécula-líder (CHIMENTO et al., 2019). Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa tem dedicado esforços na síntese e avaliação de propriedades biológicas de um grupo de análogos do RSV, denominados aza-estilbenos, os quais apresentaram previamente atividade antituberculose (PAVAN et al., 2011), antioxidante (CALIL et al., 2012) e despigmentante (FRANCO et al., 2012). Em estudos recentes, análises *in silico* e *in vitro* demonstraram a capacidade de interação entre esse grupo de análogos e a AChE (dados ainda não publicados). Um derivado em específico, aqui denominado RSVA6, demonstrou ser capaz de inibir a AChE em 92,4%, quando comparado a rivastigmina – usado como controle positivo.

Motivados pelos achados recentes, neste trabalho foram conduzidos protocolos no modelo animal de déficit cognitivo induzido pela escopolamina, a fim de avaliarmos o efeito neuroprotetor do RSVA6. Os camundongos foram submetidos a testes comportamentais e de memória. Além disso, avaliou-se, *in vitro*, a capacidade antioxidante de RSVA6 em comparação ao RSV. Ademais, as estratégias atualmente disponíveis para a abordagem terapêutica da DA ainda são muito limitadas e, por este motivo, diversos grupos científicos ao redor do mundo se dedicam a pesquisar e a desenvolver possíveis alternativas que possam retardar a progressão da doença.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. DOENÇA DE ALZHEIMER

#### 2.1.1. Aspectos gerais

O envelhecimento é um processo biológico, universal e inevitável, oriundo da interação entre fatores genéticos e ambientais, sendo este um processo dinâmico e caracterizado pela remodelagem contínua do organismo (MINCIULLO et al., 2016). Nos últimos 150 anos, a expectativa média de vida dos seres humanos tem aumentado substancialmente em diversas sociedades e, pela primeira vez na história, a maioria das pessoas pode ultrapassar a marca dos 60 anos de vida ou ir mais além (HAAN; LAZARE, 2018; WHO, 2018). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a população mundial na faixa etária acima dos 60 anos será de 2 bilhões de pessoas em 2050, sendo que 80% delas viverão em países pobres ou em desenvolvimento (WHO, 2018). Para esses países, os dados sobre o envelhecimento populacional podem representar um verdadeiro desafio já que o aumento da expectativa de vida não equivale a viver mais e de forma sadia (LONGO et al., 2015). Apesar de muitos idosos alcançarem uma idade avançada em condições saudáveis (HAAN; LAZARE, 2018), tem-se observado um aumento da prevalência de doenças associadas ao envelhecimento. Segundo López-Otín (2013), a idade é o principal fator de risco para as principais patologias humanas, incluindo o câncer, os distúrbios metabólicos e cardiovasculares e as doenças neurodegenerativas. No que diz respeito ao sistema nervoso central (SNC), o processo de envelhecimento pode vir acompanhado de déficits cognitivos, declínio de funções motoras e de uma inflamação crônica de baixo grau – conhecida como *inflammaging* (MINCIULLO et al., 2016; ABHIJIT et al., 2017), que, em conjunto, podem contribuir para o desenvolvimento de doenças como a de Alzheimer (WATSON et al., 2017).

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva que, atualmente, representa a forma mais comum de demência entre os idosos (FALCO et al., 2016). Estima-se que, no presente, cerca de 50 milhões de pessoas sofram de demência ao redor do mundo, representando um impacto econômico de US\$ 818 bilhões (MICHALOWSKY et al., 2019). As projeções apontam que, em 2050, essa prevalência pode atingir cerca de 150 milhões de pessoas (WORLD ALZHEIMER REPORT, 2018). Desse total, cerca de 70% dos casos podem ser atribuídos à DA (REITZ;

MAYEUX, 2014). No Brasil, os dados a respeito da incidência da DA são escassos ou inexistentes, representando uma lacuna no que diz respeito ao conhecimento do perfil epidemiológico da doença no país (TEIXEIRA et al., 2015). Fochat e colaboradores (2016) constataram que cerca de metade dos casos de demência registrados na Zona da Mata Mineira-Brasil em idosos acima dos 60 anos de idade são causados pela DA. Interessantemente, o Brasil vem sofrendo uma rápida transição demográfica nos últimos anos, com queda na taxa de fertilidade e aumento exponencial da população idosa (BOVOLENTA; FELÍCIO, 2017). Este fenômeno exigirá a criação de políticas públicas de saúde que priorizem o cuidado dos idosos, especialmente daqueles portadores de algum tipo de doença degenerativa, tal como a DA.

As características clínicas e patológicas da DA foram descritas pela primeira vez em 1907 pelo médico alemão Alois Alzheimer, o qual observou em uma paciente de 51 anos de idade falhas na memória recente, paranoia, problemas comportamentais e de linguagem. A necropsia desta paciente revelou um cérebro atrofiado e a presença de emaranhados fibrilares (STELZMANN; SCHNITZLEIN; MURTAGH, 1995). Apesar de muito ter sido descoberto em relação a patogenia da DA desde então, muitas são as lacunas remanescentes, as quais fizeram a OMS reconhecê-la como uma das prioridades de saúde pública global (LANE; HARDY; SCHOTT, 2017).

Em linhas gerais, o córtex cerebral e o hipocampo são as primeiras áreas cerebrais afetadas pela DA (MASTERS et al., 2015). Clinicamente, a forma mais comum de apresentação inicial da doença surge com episódios recorrentes e progressivos de falha da memória recente, que geralmente não são suficientes para um diagnóstico precoce. No segundo estágio, são observados sinais como dificuldades topográficas e de realização de tarefas simples, acompanhados de uma perda de confiança do paciente. À medida que a doença progride, as dificuldades cognitivas se tornam mais profundas, interferindo diretamente no desempenho das atividades diárias do paciente. Somente nesse estágio é que se torna possível o diagnóstico provável de demência causada por DA. Por conseguinte, o paciente torna-se cada vez mais dependente de um cuidador e, já no estágio final da doença, é comum que ocorra incapacidade motora e o aparecimento de alucinações e convulsões. A DA é, portanto, uma patologia progressiva e incurável, cuja morte do paciente ocorre, em média, 8,5 anos após o surgimento dos primeiros sintomas (LANE; HARDY; SCHOTT, 2017).

Os sinais histopatológicos mais relevantes incluem a atrofia cortical difusa, o acúmulo de placas insolúveis da proteína  $\beta$ -amiloide no meio extracelular e nas paredes de vasos sanguíneos,

a agregação de emaranhados fibrilares da proteína *tau* no interior dos neurônios, a degeneração neurovascular, a morte neuronal e a perda sináptica, impactando em diferentes sistemas de neurotransmissão (MASTERS et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2016). A Figura 1 ilustra o esquema da evolução da doença em seus diferentes estágios. Além dos achados neuropatológicos, observam-se, ainda, sinais bioquímicos que incluem neuroinflamação, estresse oxidativo difundido por todo o cérebro, alteração mitocondrial, desequilíbrio iônico e toxicidade sináptica (TEIXEIRA et al., 2016).

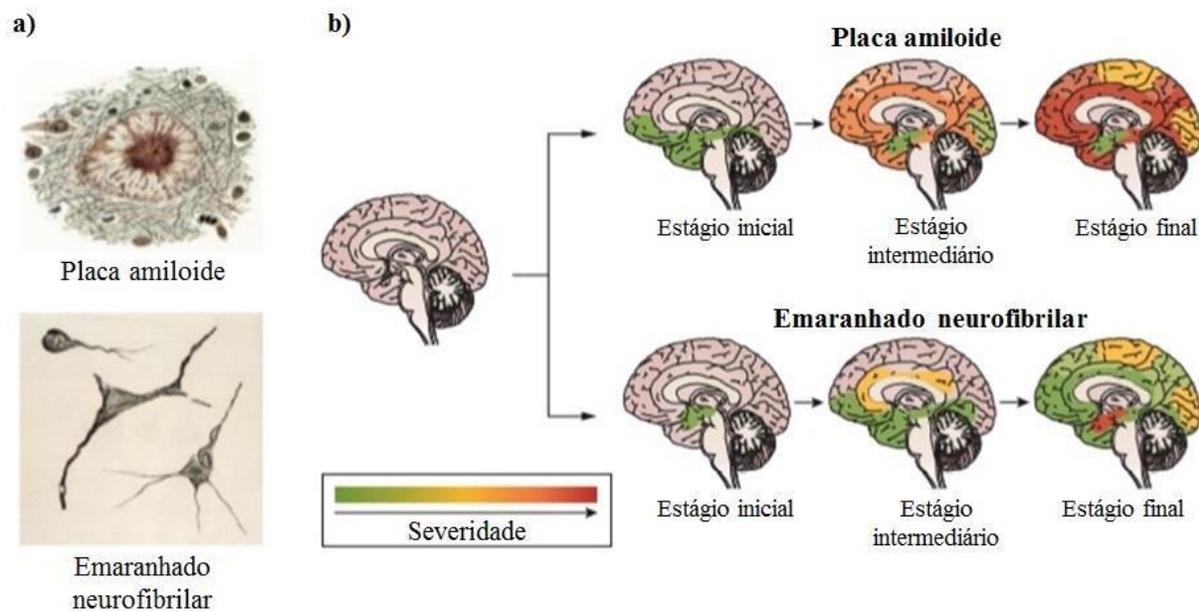


Figura 1: Evolução esquemática patológica da doença de Alzheimer e seus diferentes estágios. **a)** Placas amiloides e emaranhados neurofibrilares se espalham pelo cérebro à medida que a doença progride. **b)** Em casos típicos da doença, a deposição de placas  $\beta$ -amiloides antecede as alterações neurofibrilares e se originam, aparentemente, nos lobos frontal e temporal, hipocampo e sistema límbico (topo da imagem). Os emaranhados neurofibrilares e a degeneração neural se iniciam no lobo temporal médio e hipocampo, se espalhando progressivamente para outras áreas do neocórtex (base da imagem).

Fonte: Adaptado de MASTERS et al., 2015.

Antes, porém, da manifestação clínica da DA, um estágio prodrômico e assintomático, chamado de pré-sintomático e caracterizado por uma sequência de marcadores fisiopatológicos, pode surgir até 20 anos antes do início da doença (CROUS-BOU et al., 2017). Duas formas da doença podem ser diferenciadas a partir do seu surgimento: a DA de início precoce (*EOAD* – do inglês *Early Onset Alzheimer's Disease*) e a DA de início tardio (*LOAD* – do inglês *Late Onset Alzheimer's Disease*). A *EOAD* ocorre antes dos 65 anos de idade (em média, em torno dos 45

anos de vida) e representa 1 – 5% de todos os casos de AD. Comumente, a *EOAD* é também chamada de DA familiar (*FAD* – do inglês *Familial Alzheimer's Disease*) por já terem sido observadas mutações patogênicas nos genes que codificam a proteína precursora amiloide (*APP* – do inglês *amyloid precursor protein*), a presenilina 1 (*PSEN1*) e a presenilina 2 (*PSEN2*). Tais proteínas estão envolvidas na quebra da *APP* e na geração de  $A\beta$ . A alteração genética relacionada à DA apresenta uma alta penetrância (> 85%) sendo, na maioria das vezes, uma herança autossômica dominante (REITZ; MAYEUX, 2014). A *LOAD*, em contrapartida, representa 95% dos casos e ocorre após os 65 anos de vida. O histórico familiar não é comum nessa forma da doença, porém pode ocorrer em pequena proporção (< 1%) (BEKRIS et al., 2010; MASTERS et al., 2015).

Apesar dos esforços direcionados ao melhor entendimento da DA, sua etiologia ainda não está completamente elucidada. Além das mutações que podem ocorrer nos genes das proteínas *APP*, *PSEN1* e *PSEN2*, o polimorfismo da apolipoproteína E (*ApoE*) foi identificado como um potencial fator de risco para o surgimento da DA (BALLARD et al., 2011). Indivíduos portadores do alelo *ApoE*  $\epsilon 4$  apresentam um risco até sete vezes maior de desenvolver a doença quando comparado àqueles que possuem o alelo *ApoE*  $\epsilon 3$  (CORDER et al., 1993). Outros fatores relacionados ao desenvolvimento da DA, além da idade avançada e da predisposição genética, incluem o sexo (mulheres têm maior chance de adoecerem), nível educacional, estilo de vida, fatores psicológicos e distúrbios metabólicos (LI et al., 2016).

Até o momento, a DA pode ser definitivamente diagnosticada apenas *post mortem*. No entanto, a adoção de técnicas e critérios mais específicos torna possível o diagnóstico provável da doença (BALLARD et al., 2011), tais como a história clínica do paciente, exames físicos e testes bioquímicos, exames neurológicos e de imagem, e exames cognitivos que incluem o Exame do Estado Mental (*MMSE* – do inglês *Mini-Mental State Examination*) e a Escala de avaliação para a doença de Alzheimer – cognitiva (*ADAS-Cog* – do inglês *Alzheimer's Disease Assessment Scale*) (ALZHEIMERS-DEMENTIA/DIAGNOSIS/ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2019). Cabe ressaltar que o diagnóstico baseado na história clínica do paciente é, ainda, desafiador já que comorbidades como a doença cerebrovascular e a esclerose hipocampal, por exemplo, podem ser erroneamente diagnosticadas como DA (MASTERS et al., 2015).

### 2.1.2. Bases moleculares da doença de Alzheimer

Desde sua primeira descrição, a etiologia e os eventos patogênicos envolvidos nos estágios iniciais da DA ainda não foram completamente elucidados. Atualmente, a ciência considera que a DA seja uma patologia de origem multifatorial, heterogênea, com interação entre os diferentes mecanismos patofisiológicos envolvidos no seu surgimento (HAMPEL et al., 2018). Apesar dessa complexidade, nas últimas três décadas, algumas hipóteses têm sido propostas, a fim de elucidar as bases moleculares sob as quais a doença se desenvolve.

#### 2.1.2.1. Hipótese colinérgica

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor liberado pelos neurônios tanto no SNC quanto no sistema nervoso periférico (SNP) e junções neuromusculares (VENTURA et al., 2010). Além da neurotransmissão, essa molécula também tem sido associada a uma ação neuromoduladora (revisado por PICCIOTTO; HIGLEY; MINEUR, 2012). No cérebro humano, o sistema colinérgico central se organiza, basicamente, em seis núcleos (Ch1 – Ch6) que se diferem quanto a sua localização anatômica, padrões de projeção e características funcionais (Figura 2). O sistema colinérgico do encefalo basal é formado por quatro dos seis núcleos acima citados: o núcleo do septo medial (Ch1); os núcleos da banda da broca diagonal (Ch2 e Ch3), e o núcleo basal de Meynert (NBM; Ch4). Os neurônios dos núcleos Ch1, Ch2 e Ch3 são a principal fonte de ACh para o hipocampo e para o córtex entorrinal, enquanto aqueles do núcleo Ch4 inervam, principalmente, o córtex cerebral e a amígdala. Esses núcleos aparentam serem os principais locais de disfunção colinérgica associada à DA. No tronco cerebral estão localizados os núcleos tegumentar pedunculopontina (Ch5) e tegumentar laterodorsal (Ch6), que, ao contrário dos demais, se mantêm relativamente preservados na DA (NEWMAN et al., 2012; DOUCHAMPS; MATHIS, 2017).

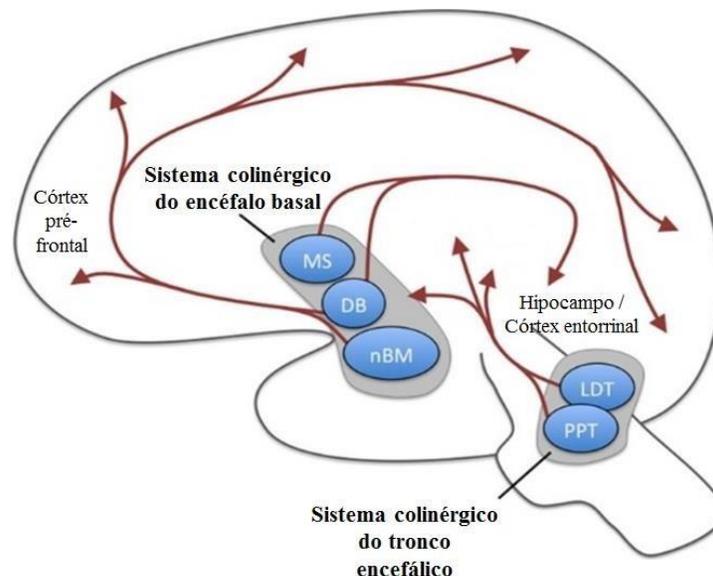


Figura 2: Representação esquemática da localização e das projeções colinérgicas no sistema nervoso central. MS: núcleo do septo medial (Ch1); DB: núcleo da banda da broca diagonal (Ch2 e Ch3); nBM: núcleo basal de Meynert (Ch4); LDT: núcleo tegumentar peduncolopontina (Ch5); PPT: núcleo tegumentar laterodorsal (Ch6).  
Fonte: Adaptado de NEWMAN et al., 2012.

A síntese de ACh na terminação nervosa é dependente da recaptação de colina pelo transportador de colina de alta afinidade (CHT1) e da enzima Colina-O-Acetil-Transferase (ChAT), a qual catalisa a acetilação da colina com a acetil-coenzima A (acetil-CoA). Uma vez sintetizada, a ACh é transportada ativamente e armazenada em vesículas sinápticas por meio do transportador vesicular de ACh (VAChT), nas quais permanecerá até a chegada do impulso nervoso. A despolarização da membrana, consequência do influxo de cálcio ( $Ca^{2+}$ ), promove a fusão das vesículas e libera ACh na fenda sináptica. O neurotransmissor, então, se liga a receptores colinérgicos dos tipos nicotínicos (íon-dependentes) e muscarínicos (acoplados à proteína G), expressos nas membranas pré- e pós-sinápticas. Na fenda sináptica, a ação da ACh é cessada pela ação das enzimas acetilcolinesterase (AChE), mais específica e em maior concentração, e butirilcolinesterase (BuChE), menos específica. A ACh é hidrolisada em acetato e colina, sendo esta recaptada por neurônios pré-sinápticos, nos quais será novamente convertida em ACh pela ChAT (VENTURA et al., 2010; DOUCHAMPS; MATHIS, 2017; PRADO et al., 2017). A Figura 3 ilustra os processos de síntese e de degradação da ACh descrito acima.

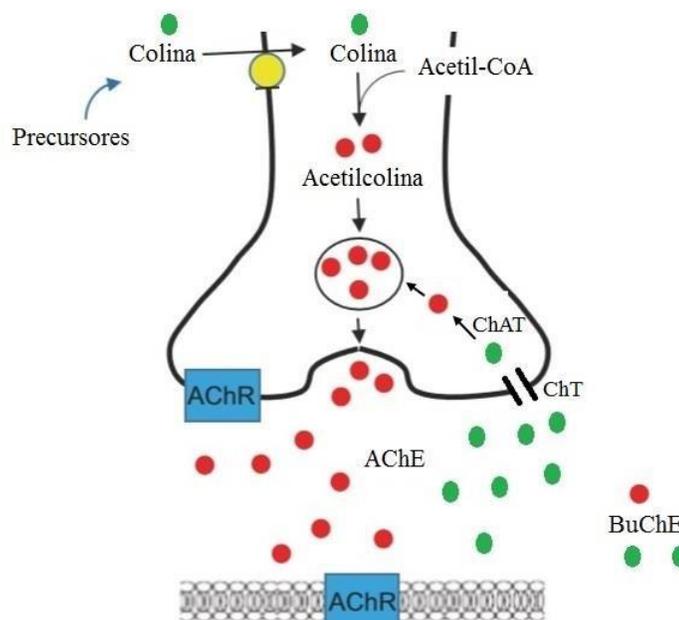


Figura 3: Síntese e degradação da acetilcolina na fenda sináptica. AChR: receptores de acetilcolina; AChE: acetilcolinesterase; BuChE: butirilcolinesterase; ChT: transportador de colina; ChAT: colina-O-acetiltransferase.

Fonte: Adaptado de DULAWA; JANOWSKY, 2018.

A hipótese colinérgica no contexto da DA foi formulada há pouco mais de trinta anos e é a teoria mais antiga que tenta descrever as bases moleculares da patologia. Nesta, as disfunções no sistema colinérgico estariam correlacionadas aos déficits cognitivos associados à doença (BARTUS et al., 1982). Entre as décadas de sessenta a oitenta, diferentes pesquisadores convergiram esforços em estudos que culminaram na descoberta e na caracterização não somente de neurotransmissores e seus receptores, mas também no delineamento da neuroanatomia química do cérebro (CONTESTABILE, 2011). A partir de amostras cerebrais autópticas de pacientes portadores da DA, pode-se constatar a diminuição da concentração da ChAT no córtex e no hipocampo, além da depleção dos neurônios colinérgicos situados no núcleo basal de Meynert (Ch4). Associada a essas descobertas, a demonstração de que antagonistas colinérgicos eram capazes de prejudicar a memória e que os agonistas, ao contrário, exerciam efeitos benéficos sobre os déficits cognitivos associados ao envelhecimento, formaram a base de evidências científicas que sustentou o surgimento da teoria colinérgica (FALCO et al., 2016; DOUCHAMPS; MATHIS, 2017; HAMPEL et al., 2018).

A disfunção colinérgica até então observada na DA serviu de alicerce para que medicamentos colinomiméticos fossem clinicamente testados. Em 1993, o *Food and Drug*

*Administration (FDA)* aprovou a tacrina (Cognex®) como o primeiro medicamento destinado ao tratamento da DA (ASHFORD, 2015), exercendo ação farmacológica pela inibição da AChE (PARK et al., 2015). Em sequência, outros inibidores da AChE foram aprovados (tais como donepezil, galantamina e rivastigmina), sendo os principais fármacos comercialmente usados, até o momento, para o tratamento da doença. Os inibidores da AChE serão revisados mais detalhadamente na seção “2.1.3. Tratamentos farmacológicos”.

Ainda, os avanços científicos e tecnológicos dos últimos anos geraram evidências as quais demonstram o papel complexo e multifatorial da DA, visto que a depleção colinérgica não é a única causa patológica. Não há dúvidas, no entanto, de que a disfunção colinérgica seja um evento importante na progressão da doença, além de ser alvo terapêutico valioso na abordagem polifarmacêutica das terapias paliativas, as quais objetivam melhorar a eficácia do tratamento (CONTESTABILE, 2011), visto que ainda não há cura para a DA.

#### 2.1.2.2. Hipótese da cascata amiloide

A hipótese da cascata  $A\beta$  sugere que a neurodegeneração característica da DA é causada pelo acúmulo anormal, em diferentes regiões cerebrais, de placas formadas pela agregação do peptídeo  $A\beta$ . Essas placas seriam responsáveis por desencadear diversas cascatas bioquímicas, incluindo a ativação da microglia e a formação de emaranhados neurofibrilares, que propiciariam, então, a mudanças bioquímicas e estruturais nos neurônios subjacentes à deposição, resultando em perda sináptica, morte neuronal e atrofia cerebral (BARAGE; SONAWANE, 2015; ZHOU et al., 2018).

As placas senis são formadas por fragmentos proteolíticos de peptídeos  $A\beta$ , derivados da *APP* (NHAN; CHIANG; KOO, 2015). O processamento proteolítico da *APP* segue duas vias bioquímicas diferentes, porém paralelas, as quais ocorrem em equilíbrio. A via não-amiloidogênica, catalisada pelas enzimas  $\alpha$ -secretase e  $\gamma$ -secretase, é assim chamada por produzir  $\alpha$ -peptídeos solúveis e metabolizados fisiologicamente (PARONI; BISCEGLIA; SERIPA, 2019). Já a via amiloidogênica (Figura 4) gera peptídeos  $A\beta$ , insolúveis e propensos à formação de oligômeros. Nesta via, a *APP* é catalisada pela  $\beta$ -secretase (BACE – do inglês  *$\beta$ -amyloid cleaving enzyme*) e, em sequência, pela  $\gamma$ -secretase, gerando fragmentos de aminoácidos com 40 e 42 resíduos ( $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$ , respectivamente). Apesar de o fragmento  $A\beta_{1-40}$  ser a isoforma predominante, o maior potencial amiloidogênico é atribuído à fração  $A\beta_{1-42}$ , pois esta possui dois

resíduos hidrofóbicos adicionais na porção C-terminal, potencializando a sua tendência à agregação (WALKER, 2016). Os peptídeos  $A\beta$  podem ser encontrados sob a forma de monômeros ou oligômeros, estes últimos compostos por dímeros ou trímeros. Além destes, observam-se ainda as fibrilas, estruturas intermediárias entre os agregados oligoméricos e as placas senis (FALCO et al., 2016).

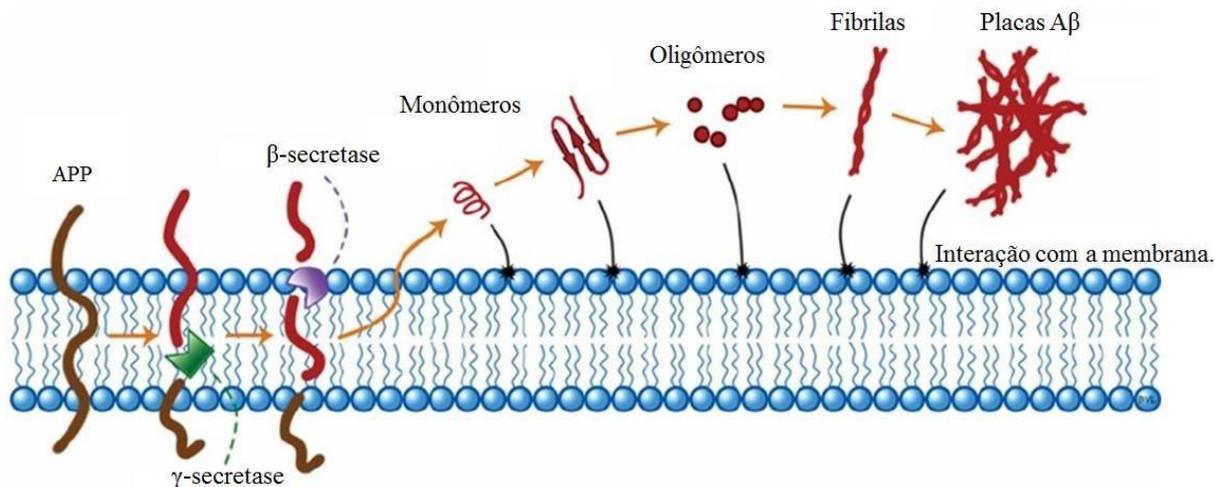


Figura 4: Origem, mecanismo de formação e toxicidade da placa amiloide. *APP*: proteína precursora amiloide; *Aβ*: beta-amiloide.

Fonte: Adaptado de DROLLE et al., 2014.

Diversas observações clínicas e genéticas suportam a hipótese da cascata amiloide no contexto da DA. O gene codificador da *APP*, por exemplo, está localizado no cromossomo 21. Interessantemente, boa parte dos indivíduos com síndrome de Down (trissomia do cromossomo 21) desenvolve neuropatologia típica à DA quando alcançam a idade adulta (SELKOE; HARDY, 2016), a qual tem sido atribuída justamente à triplicação ou aumento da expressão do gene da *APP* (RICCIARELLI; FEDELE, 2017). A partir dessa observação, foram identificadas naquele cromossomo seis mutações autossômicas dominantes diferentes, sendo cinco delas associadas à forma familiar da DA (FALCO et al., 2016).

Outra observação genética que sustenta a teoria da cascata amiloide é a ocorrência da forma familiar da DA em indivíduos que apresentam mutações autossômicas dominantes nos genes *PSEN1* e *PSEN2*, os quais codificam as presinilinas 1 e 2. Esses dois genes são homólogos e suas funções fisiológicas ainda não foram completamente elucidadas. Porém, sabe-se que os mesmos estão envolvidos na geração de resíduos aspartato, requeridos no sítio ativo catalítico da  $\gamma$ -secretase, e que uma mutação tanto em *PSEN1* quanto em *PSEN2* pode alterar o padrão de quebra

enzimático, culminando com o aumento dos níveis de peptídeos  $A\beta$  (BARAGE; SONAWANE, 2015).

Além dos fatores supramencionados, o polimorfismo da lipoproteína ApoE é outro fator de risco primordial que apoia a hipótese amiloide. Dentre as três isoformas proteicas codificadas pela ApoE (ApoE  $\epsilon 2$ , ApoE  $\epsilon 3$  e ApoE  $\epsilon 4$ ), ApoE  $\epsilon 4$  está relacionada com maior risco de surgimento da forma esporádica da DA, sendo ainda maior para homozigotos, quando comparado aos heterozigotos (RUKMANGADACHAR; BOLLU, 2019). Sabe-se que a ApoE está envolvida no transporte e no *clearance* de  $A\beta$  e que as diferentes isoformas possuem diferentes afinidades pelo peptídeo, muito embora ApoE  $\epsilon 4$  possua a menor afinidade (CASTELLANI; PLASCENCIA-VILLA; PERRY, 2019).

Apesar de as placas  $A\beta$  serem consideradas, juntamente aos emaranhados neurofibrilares, marcadores patológicos da DA, evidências científicas questionam a teoria amiloide como sendo o evento central na patogenia da doença (RICCIARELLI; FEDELE, 2017). No estudo longitudinal, Villemagne e colaboradores (2011) avaliaram a deposição de  $A\beta$  e a sua relação com a cognição e a progressão da DA. Os resultados apontaram que, apesar de a deposição de placas senis continuarem ocorrendo entre os estágios moderado e severo da doença, o declínio cognitivo não estaria diretamente relacionado a esse aumento, sugerindo assim que outros fatores exerceriam maior efeito na progressão dos sintomas (VILLEMAGNE et al., 2011). Outra questão levantada refere-se ao modelo animal utilizado nos estudos sobre a patofisiologia da  $A\beta$ . Camundongos transgênicos para a DA possuem mutações comuns à forma familiar da doença, o que não seria representativo para a *LOAD*, forma esporádica e mais comum da doença, já que a manifestação da DA ocorre em idades diferentes, com sintomas cognitivos e progressões diferentes entre os dois grupos, mesmo havendo similaridade entre as características anatômicas e patológicas nas duas formas de DA (KOMAROVA; THALHAUSER, 2011). Além disso, apesar de algumas substâncias químicas terem sido capazes de eliminar as placas senis em pacientes com DA, elas não foram capazes de reverter o quadro da neurodegeneração (ZHOU et al., 2018). Diante do exposto, pode-se sugerir que as evidências atuais tanto suportam quanto rejeitam a hipótese amiloide, sendo inexequível tecer qualquer conclusão a esse respeito.

### 2.1.2.3. Hipótese da proteína tau

Além das placas senis, outra característica patológica da DA é a presença intracelular de emaranhados neurofibrilares constituídos pela proteína *tau* (TROJANOSKI; MATTSON, 2003). Segundo a hipótese da proteína *tau*, seria justamente essa proteína o princípio causal da DA. Esta pertence a um grupo de proteínas associadas aos microtúbulos, comumente, expressa nos axônios neuronais. Sua principal função é a estabilização dos microtúbulos, os quais estão envolvidos em diversas funções neuronais, incluindo a manutenção da cito-arquitetura e o transporte axonal de organelas e vesículas. Dentro das vesículas, os neurotransmissores e as proteínas são transportados para as sinapses distais, partindo do corpo celular (PAULA; GUIMARÃES; FORLENZA, 2009).

No cérebro adulto, foram identificadas seis isoformas da proteína *tau*, derivadas de um único gene localizado no cromossomo 17, cuja expressão é regulada ao longo do desenvolvimento do cérebro humano (KOLAROVA et al., 2012). A estrutura da *tau* é essencial para a manutenção das suas funções celulares, e análises sequenciais demonstraram que a proteína contém três domínios principais. Na porção C-terminal da molécula encontra-se três ou quatro domínios de ligação da tubulina (constituente unitária dos microtúbulos) envolvidos na polimerização e na estabilização microtubular (MIETELSKA-POROWSKA et al., 2014). Estes domínios são constituídos de repetidas sequências de serina, treonina e prolina (BARAGE; SONAWANE, 2015). A região mediana da proteína, por sua vez, possui diversos resíduos de prolina, alvo para a ação de diferentes quinases. Finalmente, a porção N-terminal da *tau* é rica em aminoácidos acídicos, os quais não se ligam aos microtúbulos, porém se projeta para além deles. Essa região possivelmente interage com outros elementos do citoesqueleto, com mitocôndrias e/ou com a membrana plasmática neuronal (MIETELSKA-POROWSKA et al., 2014).

A proteína *tau* pode sofrer diversas modificações pós-transducionais, as quais incluem a fosforilação, a glicosilação, a glicação, a nitração, a acetilação, a isomerização e a oxidação, dentre outras (MARTIN; LATYPOVA; TERRO, 2011). A fosforilação é a modificação comumente descrita e, quando ocorre em condições fisiológicas, é essencial para que a *tau* opere suas funções celulares. Uma molécula de *tau* contém cerca de 80 resíduos de serina e treonina disponíveis para fosforilação, a maioria deles localizados nas proximidades da região rica em prolina e da porção C-terminal da proteína (KOLAROVA et al., 2012). Em condições fisiológicas, parece haver um balanço entre *tau* quinases (responsáveis pela fosforilação da *tau*) versus *tau* fosfatases (responsáveis pela remoção do grupamento fosfato da molécula). Entretanto, sob condições

patológicas, pode ocorrer uma hiperfosforilação da *tau* como resultado de uma regulação positiva das quinases (GUO; NOBLE; HANGER, 2017). Dentre as quinases, a glicogênio sintase quinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), também chamada de *tau* quinase é a responsável por modificar o maior número de sítios da proteína *tau* (AVILA, 2018). O aumento, tanto da concentração de GSK3 $\beta$  quanto da sua atividade no SNC, parece correlacionar com a progressão da neurodegeneração evidenciada na DA, contribuindo significativamente para a hiperfosforilação da *tau* (TALIB et al., 2015; GUO; NOBLE; HANGER, 2017).

Nos neurônios, a hiperfosforilação da *tau* promove alterações em diferentes processos que são diretamente regulados pela rede de microtúbulos (MANDELKOW et al., 2003; LAPOINTE et al., 2009). Em neurônios afetados pela DA, proteína *tau* citosólica hiperfosforilada é incapaz de se ligar à tubulina ou de promover a estabilização dos microtúbulos (KOLAROVA et al., 2012). Além disso, sob a condição de hiperfosforilação, a *tau* pode polimerizar-se sob o formato de filamentos helicoidais pareados (FHP) e filamentos retos (FR), chamados de emaranhados neurofibrilares (MIETELSKA-POROWSKA et al., 2014), conforme ilustrado na Figura 5.

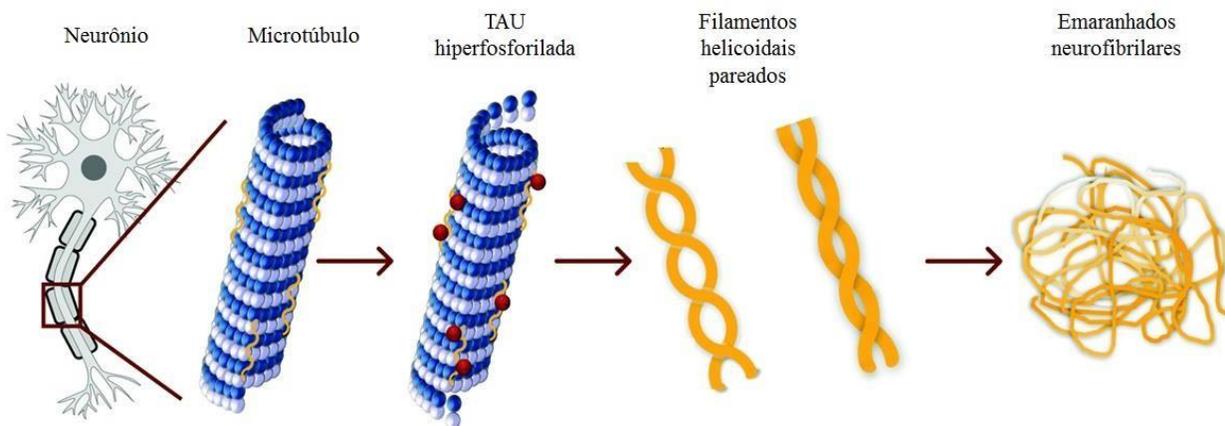


Figura 5: Formação de emaranhados neurofibrilares a partir da hiperfosforilação da proteína *tau*, durante o desenvolvimento e progressão da doença de Alzheimer.

Fonte: Adaptado de VERWILST et al., 2018.

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a correlação entre o acúmulo de placas  $A\beta$  e a hiperfosforilação da proteína *tau* (BLOOM, 2014). Primeiramente,  $A\beta$  causaria a hiperfosforilação da *tau*, que por sua vez, mediará a neurotoxicidade. Uma segunda abordagem atribui à toxicidade da  $A\beta$  à presença da *tau* nos dendritos. Ainda, tanto a  $A\beta$  quanto a proteína *tau* agiriam

sinergicamente em processos celulares e organelas, amplificando ambas as toxicidades (ITTNER; GÖTZ, 2010).

Apesar das evidências existentes até o momento, as condições fisiológicas e patológicas relacionadas à hiperfosforilação da proteína *tau* ainda não estão claramente elucidadas. Além disso, o entendimento da DA como uma doença multifatorial excluiria a teoria de que os emaranhados neurofibrilares seriam, isoladamente, os desencadeadores da DA. No entanto, isso não exclui a participação da proteína *tau* na gênese e/ou progressão da DA.

#### 2.1.2.4. Hipótese da neuroinflamação

De acordo com Heneka e colaboradores (2015), as evidências sugerem a ocorrência de fortes interações imunológicas cerebrais na fisiopatologia da DA, não restringindo, dessa maneira, o processo apenas ao compartimento neuronal. Apesar do envolvimento dos já discutidos marcadores patológicos da DA (placas  $A\beta$  e emaranhados neurofibrilares) no surgimento e na progressão da doença, está cada vez mais claro que a DA é modificada coletivamente pelo envolvimento de diferentes fatores genéticos, os quais, conjuntamente, governam cascatas celulares e moleculares, incluindo mediadores e genes relacionados à resposta imunológica (CAO; ZHENG, 2018).

Assim, na hipótese neuroinflamatória relacionada à DA, mediadores inflamatórios seriam essenciais para a produção e regulação do  $A\beta$ , assim como dos emaranhados da proteína *tau*. Os astrócitos e a microglia poderiam ser ativados por citocinas e, então, passariam a serem os principais emissores dos sinais neuroinflamatórios. A partir daí essas células poderiam contribuir para as disfunções metabólicas neuronais e excitotoxicidade, capazes de ocasionar disfunção cerebral e deterioração cognitiva e, conseqüentemente, dano axonal e morte neuronal. As placas  $A\beta$  e os emaranhados intracelulares podem agir como agentes pró-inflamatórios, estimulando a proliferação e a ativação de astrócitos e de microglia. No entanto, os mecanismos relacionados à “neuroinflamação – marcadores patológicos” ainda não foram totalmente elucidados (MAGALHÃES et al., 2018).

Além da resposta imunológica que ocorre no ambiente cerebral, evidências clínicas e experimentais indicam, ainda, o envolvimento do sistema imunológico periférico na patogênese da DA. A inflamação crônica de baixo grau, também conhecida como *inflammaging*, é uma característica do processo de envelhecimento que pode ocorrer secundariamente ao estado

fisiológico ou patológico de diversas doenças. Nas pessoas idosas, essa pré-disposição à inflamação crônica pode ocorrer independente de um processo patológico, como resultado de diferentes mudanças fisiológicas relacionadas à idade, incluindo a senescência celular e o acúmulo de *debris* celulares (WATSON et al., 2017; WALKER, 2019). Achados recentes indicam que o *inflammaging* poderia causar ou perpetuar o estado de neurodegeneração observado nos pacientes com DA. A neuroinflamação poderia ser também causada por mediadores inflamatórios periféricos que cruzariam a barreira hematoencefálica e, posteriormente, aumentariam sua permeabilidade (WALKER, 2019). Em pacientes com DA, essa barreira poderia estar danificada pelo acúmulo de  $A\beta$  nos vasos sanguíneos (angiopatia cerebral amiloide), conduzindo a uma inflamação vascular, a qual poderia gerar uma comunicação entre o cérebro e o sistema imunológico periférico (TAKEDA; SATO; MORISHITA, 2014). Uma vez rompida a permeabilidade da barreira hematoencefálica, as células do sistema imunológico, juntamente, aos mediadores periféricos produzidos, poderiam se comunicar diretamente com o SNC e desencadear cascatas de sinalização, que, ao longo do tempo, poderiam conduzir a alterações funcionais e estruturais no cérebro (WALKER, 2019).

Nos últimos anos, a ciência tem investigado o papel das enzimas da família fosfolipase A2 (PLA2 – do inglês *phospholipase A2*) em diversos aspectos que envolvem os processos inflamatórios periféricos e centrais. As PLA2 estão envolvidas na homeostase das membranas fosfolipídicas (TALIB et al., 2015), e a atividade catalítica dessas enzimas libera ácidos graxos sob a forma livre, tal como o ácido araquidônico (AA). Esses ácidos graxos são precursores de diferentes mediadores lipídicos bioativos pró-resolução, tais como resolvinas, maresinas e protectinas que, por sua vez, possuem funções biológicas, incluindo o papel imunomodulador da resposta inflamatória (LÓPEZ-VALES; DAVID, 2019). Interessantemente, alterações no metabolismo fosfolipídico e, conseqüentemente, nos níveis de PLA2 têm sido reportadas na DA (MURY et al., 2016).

### **2.1.3. Tratamentos farmacológicos**

O surgimento das hipóteses que tentam explicar as bases moleculares da DA direcionou (e ainda direciona) diversos grupos de pesquisa na busca por terapias farmacológicas capazes de reverter ou mesmo estabilizar o quadro patológico que se instala no paciente. Entretanto, apesar de todo o progresso na investigação da doença nos últimos anos, ainda não existe uma cura para

DA. Os tratamentos disponíveis têm o objetivo clínico de aliviar os sintomas cognitivos, comportamentais e psicológicos da doença, objetivando conjuntamente desacelerar a progressão da doença. No entanto, os efeitos observados são modestos e temporários (COIMBRA, 2016).

Atualmente, existem apenas quatro opções terapêuticas aprovadas pela agência reguladora americana, FDA, e disponíveis no mercado direcionados ao tratamento sintomático da DA, e todas essas objetivam contrabalancear o distúrbio neurotransmissor da doença (YIANNOPOULOU; PAPAGEORGIOU, 2013). Os inibidores da AChE são utilizados no tratamento sintomático de estágios leves a moderados da doença, enquanto a memantina (Namenda®), antagonista dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), foi aprovada para o tratamento dos sintomas de DA moderada e severa (BRIGGS; KENNELLY; O'NEILL, 2016). Além das duas classes citadas, antidepressivos e antipsicóticos também são utilizados para o alívio dos sintomas comportamentais da doença (BALLARD; CORBETT, 2010). Nesta revisão, será dada maior atenção aos inibidores da AChE.

#### *2.1.3.1. A enzima acetilcolinesterase*

A AChE é uma enzima colinérgica encontrada, principalmente, nas junções pós-sinápticas nervosas e musculares. A ação principal da enzima consiste na hidrólise da ACh em ácido acético e colina, finalizando, dessa maneira, a transmissão neuronal e a sinalização sináptica desencadeada pelo neurotransmissor (TRANG; KHANDHAR, 2019). Os inibidores da AChE (iAChEs) impedem a quebra da ACh, gerando acúmulo deste neurotransmissor na fenda sináptica (PARMAR; HIGHLAND; GEORGE, 2018).

Estruturalmente, a AChE possui três ramificações e cada uma delas representa uma unidade enzimática, a qual é composta por quatro subunidades proteicas. Cada uma dessas subunidades é capaz de hidrolisar a ACh. Dessa forma, há um total de 12 sítios ativos por enzima (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016), conforme ilustrado na Figura 6.

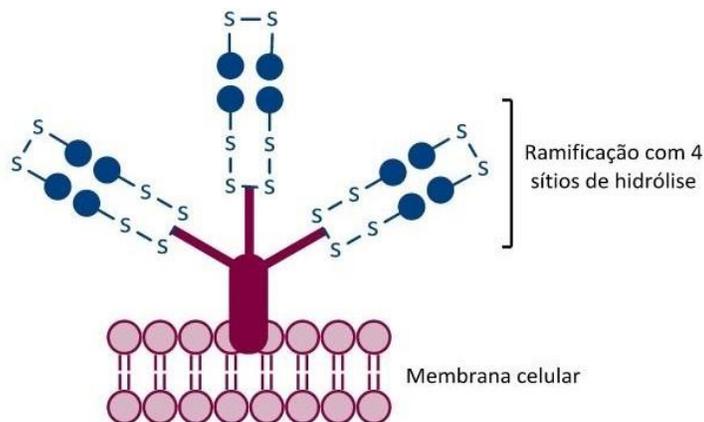


Figura 6: Representação esquemática da enzima acetilcolinesterase.  
 Fonte: ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016.

Cada subunidade da AChE possui um sítio catalítico composto pelos resíduos de serina (Ser<sub>200</sub>), histidina (His<sub>440</sub>) e ácido glutâmico (Glu<sub>334</sub>). Estes aminoácidos compõem a tríade catalítica envolvida diretamente no processo de quebra da ACh. Além do sítio catalítico, existe uma região aniônica que interage com a porção catiônica da ACh, orientando a parte carregada do substrato a entrar no centro ativo (PETRONILHO; PINTO; VILLAR, 2011). Essa função de orientação do substrato é desempenhada pelos resíduos de triptofano (Trp<sub>84</sub>). Existe ainda um terceiro domínio na enzima, constituído por uma porção hidrofóbica e importante para a ligação com substratos cíclicos. Mais distante do sítio ativo, encontra-se um quarto domínio constituído dos resíduos de aspartato (Asp<sub>74</sub>) e triptofano (Trp<sub>286</sub>), chamado de sítio aniônico periférico (MATOS, 2012), no qual ocorre a ligação inicial da ACh na enzima, essencial para que haja um aumento da probabilidade de o substrato seguir para a centro ativo da AChE (SANTOS, 2009). A Figura 7 representa, esquematicamente, os sítios de ligação da AChE.

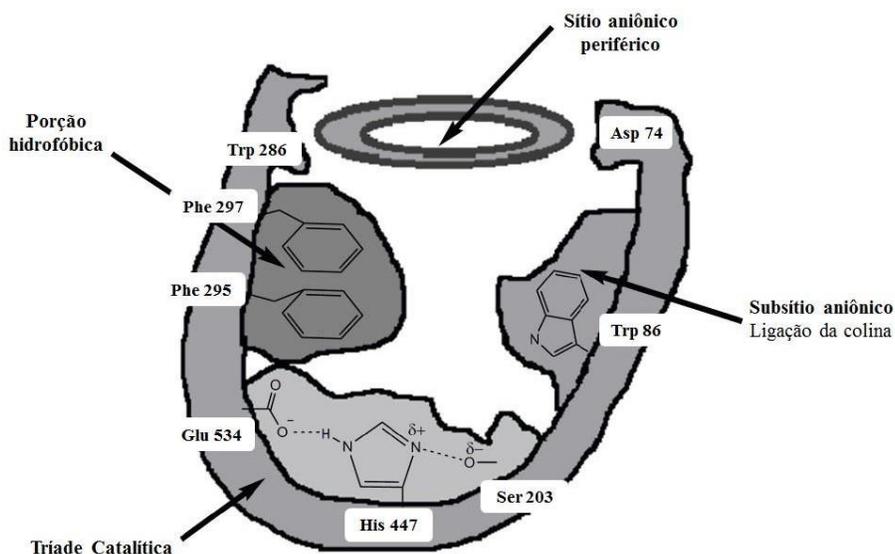


Figura 7: Representação esquemática dos sítios de ligação da enzima acetilcolinesterase.

Fonte: Adaptado de COLOVIĆ et al., 2013.

No sítio catalítico onde ocorre a hidrólise da ACh, o resíduo His<sub>440</sub> age como um catalisador ácido-base, enquanto o resíduo Ser<sub>200</sub> age como um nucleófilo. A reação se inicia com a chegada da ACh no sítio ativo da enzima. Primeiramente, o par de elétrons da hidroxila (–OH) presente no resíduo de serina ataca a carbonila (R – C = O) do neurotransmissor, enquanto a histidina age como uma base, visto que retira um próton (H<sup>+</sup>) do íon hidroxônio (H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>) formado. Em uma segunda etapa, a histidina protonada, agindo como um ácido, doa um H<sup>+</sup> para a porção colina da ACh. Essa porção é, então, liberada da molécula, deixando a AChE acetilada. Nesse ponto, ocorre uma hidrólise e a água faz o papel de nucleófilo, formando ácido acético. O resíduo de serina é, então, liberado e o sítio catalítico da AChE fica disponível para uma nova hidrólise do neurotransmissor (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016). Uma representação esquemática da hidrólise da ACh que ocorre no sítio ativo da AChE encontra-se na Figura 8.

Além da hidrólise da ACh, foram descobertas funções não-colinérgicas da AChE. Algumas evidências sugerem que a enzima teria papel essencial no desenvolvimento das placas senis, pois aceleraria a deposição da Aβ (ANAND; SINGH, 2013). A AChE, através do seu sítio aniônico periférico, forma complexos estáveis com as placas senis (BARTOLINI et al., 2003) que demonstraram serem mais tóxicos que a Aβ isoladamente (REYES et al., 2004; DINAMARCA et

al., 2010). Tais descobertas sugerem o papel fundamental da AChE não só na gênese, mas também na progressão da DA (ANAND; SINGH, 2013).

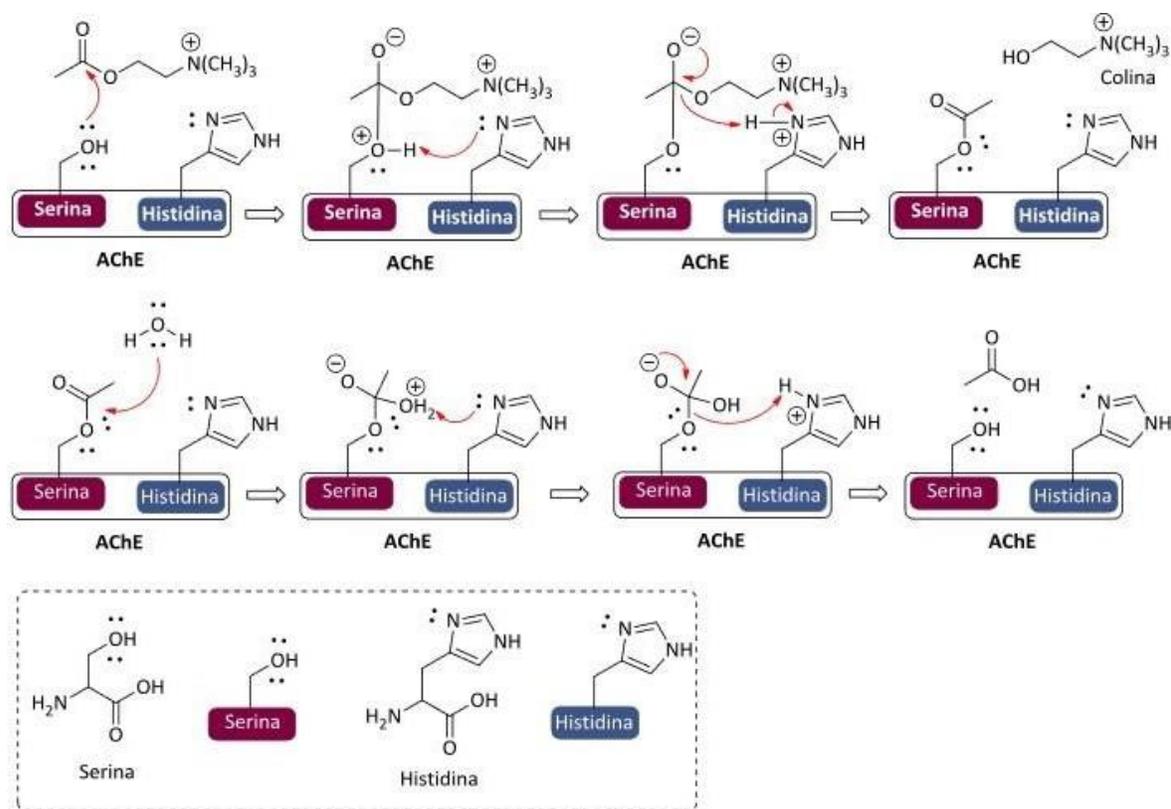


Figura 8: Representação esquemática da hidrólise da acetilcolina que ocorre no sítio ativo da enzima acetilcolinesterase.

Fonte: ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016.

### 2.1.3.2. Inibidores da acetilcolinesterase utilizados na DA

Tão logo a hipótese colinérgica surgiu, o estímulo do sistema colinérgico tornou-se a principal estratégia terapêutica em estudos pré-clínicos e clínicos, os quais buscavam avaliar o efeito de diferentes moléculas no déficit cognitivo em condições de envelhecimento fisiológicas e patológicas (DOUCHAMPS; MATHIS, 2017). Enquanto os precursores da ACh e agonistas muscarínicos falharam, de maneira geral, em melhorar a função colinérgica no SNC, os inibidores da AChE demonstraram efeitos cognitivos satisfatórios (DOUCHAMPS; MATHIS, 2017). Assim, em 1993, a tacrina (Cognex®, Figura 9) se tornou o primeiro iAChE aprovado pelo FDA para o tratamento da DA (DEARDORFF; FEEN; GROSSBERG, 2015). Entretanto, estudos apontaram a molécula como capaz de induzir o aumento sérico de transaminases, como a alanina

aminotransferase (ALT), sugerindo dano hepático em cerca de 50% dos pacientes (LOU et al., 2015). Por este motivo, este fármaco não é mais empregado como terapia farmacológica no tratamento da DA (IBRAHIM; GABR, 2019).

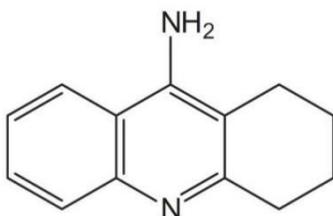


Figura 9: Estrutura química da tacrina.  
Fonte: FALCO et al., 2016.

Atualmente, os iAChE comumente prescritos para o tratamento sintomático da DA incluem a donepezila (Aricept®), a rivastigmina (Exelon®) e a galantamina (Cogliva®), cujas estruturas químicas estão representadas na Figura 10.

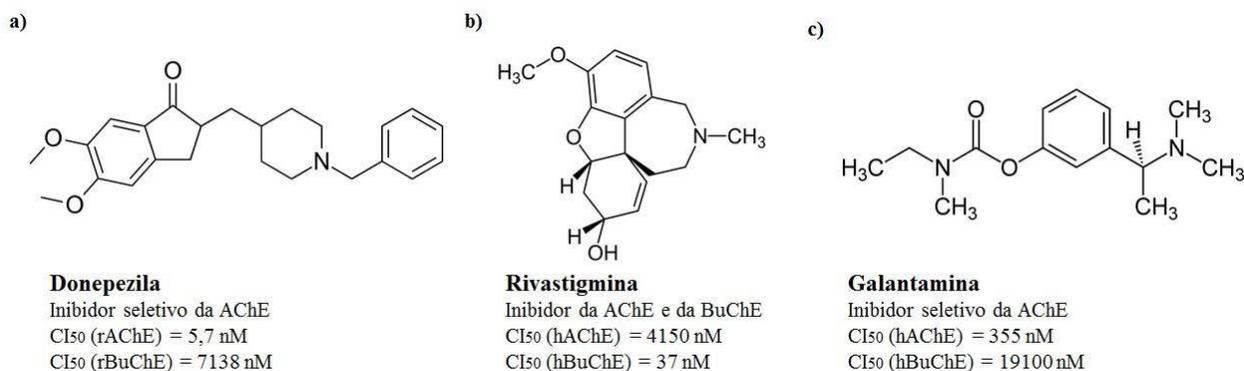


Figura 10: Estrutura química dos inibidores da enzima acetilcolinesterase aprovados para o tratamento da doença de Alzheimer. a) donepezila, b) rivastigmina e c) galantamina. AChE: acetilcolinesterase; rAChE: acetilcolinesterase murina; rBuChE: butirilcolinesterase murina; hAChE: acetilcolinesterase humana; hBuChE: butirilcolinesterase humana. CI<sub>50</sub>: concentração necessária para inibir 50% da enzima.

Fonte: Adaptado de KNEZ et al., 2017.

- **Donepezila**

A donepezila (Figura 10a) foi aprovada em 1996 para o tratamento dos estágios leve e moderado da DA (MEHTA; ADEM; SABBAGH, 2012), e, em 2006, foi indicada para tratar também o estágio avançado da doença (FDA, 2012). O fármaco é um inibidor seletivo e reversível da AChE, ligando-se ao sítio aniônico periférico da enzima. Encontra-se disponível sob as formas

farmacêuticas de solução oral e de comprimido, apresenta biodisponibilidade oral de 100% e atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, além de apresentar excreção lenta. Pode ser administrada uma única vez ao dia, com tempo de meia-vida de 70 horas. A dose inicial geralmente prescrita é de 5 mg, podendo ser aumentada para 10 mg após algumas semanas. Recentemente, uma dose diária de 23 mg foi aprovada para os casos severos da DA (COLOVIĆ et al., 2013). Entretanto, a dosagem de 23 mg/dia foi associada a efeitos adversos colinérgicos típicos no sistema gastrointestinal. Ainda assim, a análise do risco/benefício suporta o uso dessa dose (FARLOW et al., 2011). Além do efeito inibitório da AChE, acredita-se que a donepezila possa agir também nos níveis molecular e celular em praticamente todos os estágios da DA. Esses efeitos adicionais incluem a indução da forma neuroprotetiva da AChE, bloqueio do estresse oxidativo e a redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (JACOBSON; SABBAGH, 2008).

- **Rivastigmina**

A rivastigmina (Figura 10b) foi aprovada no ano de 2000 para o tratamento do estágio leve a moderado da DA. A molécula atua por meio da ligação não seletiva (também se liga à BuChE) e prolongada na porção aniônica do sítio ativo da enzima, e por isso é chamada de “pseudo-irreversível” (COLOVIĆ et al., 2013). A rivastigmina está disponível sob as formas farmacêuticas de cápsula, de solução oral e de adesivo transdérmico. Essa última está relacionada à maior adesão do paciente ao tratamento e à redução dos efeitos adversos (DEARDORFF; FEEN; GROSSBERG, 2015). A dose diária varia de 1,5 a 13,3 mg, a depender da forma farmacêutica (ver Tabela 1). Os efeitos adversos estão relacionados com a ação colinérgica da molécula, incluindo náusea, vômito, diarreia, anorexia e dor abdominal (BIRKS et al., 2009).

- **Galantamina**

Aprovada para o uso nos estágios leve a moderado da DA em 2001, a galantamina (Figura 10c) é um inibidor seletivo, competitivo e reversível da AChE que se liga tanto ao subsítio aniônico quanto à porção hidrofóbica da enzima. Além disso, a molécula também é capaz de se ligar alostericamente aos receptores colinérgicos nicotínicos (AGO et al., 2011; POHANKA, 2011). Após a administração por via oral, a absorção é rápida e completa, apresentando biodisponibilidade entre 80% e 100%. Geralmente, o tratamento é iniciado com uma dose de 4 mg, administrada duas vezes ao dia, podendo ser gradualmente elevado à 12 mg e duas administrações diárias (TAYEB

et al., 2012). Os efeitos adversos são similares àqueles observados para os iAChEs supramencionados. Além dos efeitos sobre o sistema colinérgico, a galantamina pode estimular a liberação de outros neurotransmissores (tais como dopamina e serotonina) já que ela interage com os receptores nicotínicos e estes se localizam, também, nos terminais de neurônios não-colinérgicos (AGO et al., 2011). Tal fato sugere o efeito pleiotrópico do fármaco.

A Tabela 1 apresenta resumo comparativo entre os três iAChE acima descritos, quanto às formas de apresentação, dosagem usual e estágio da DA no qual são mais efetivos.

Tabela 1: Comparação entre os inibidores da enzima acetilcolinesterase disponíveis no mercado para o tratamento da doença de Alzheimer.

<b>Fármaco</b>	<b>Forma Farmacêutica</b>	<b>Dosagem</b>	<b>Indicação</b>	<b>Outras informações</b>
Donepezila	Comprimido	5; 10; 23 mg	Leve a severa	Bem tolerado
	Comprimido de desintegração oral	5; 10 mg		
Rivastigmina	Cápsula	1,5; 3; 4; 5; 6 mg	Leve a severa	Efeitos no trato gastrointestinal
	Solução oral	2 mg mL <sup>-1</sup>		
	Adesivo transdérmico	4,6 mg/24 h, 9,5 mg/24 h, 13,3 mg/24	Moderada a severa	Melhor tolerado
Galantamina	Comprimido de liberação imediata	4; 8; 12 mg	Leve a moderada	Efeitos no trato gastrointestinal
	Comprimidos de liberação prolongada	8; 16; 24 mg		
	Solução oral	4 mg mL <sup>-1</sup>		

Fonte: Adaptado de GLYNN-SERVEDIO; RANOLA, 2017.

Apesar dos diferentes benefícios cognitivos e comportamentais atribuídos ao uso dos iAChE, ao menos metade dos pacientes com DA são refratários ao tratamento (KUMAR; SINGH; EKAVALI, 2015). Enquanto que para a outra metade dos pacientes, a eficiência clínica dos mesmos é considerada restrita, uma vez que estes fármacos apenas aliviam os sintomas da DA por

um determinado período (MÉNDEZ-ROJAS et al., 2018). Dessa maneira, a busca por soluções farmacológicas capazes de prevenir ou tratar/curar a DA se faz tão necessária quanto atual.

#### **2.1.4. Memória e modelos animais da DA**

A perda da memória episódica é a principal manifestação clínica inicial da DA, acompanhada por falha progressiva de outras funções cognitivas (TELLECHEA et al., 2018). Conceitualmente, memória é o produto gerado a partir dos processos de aquisição, de consolidação, de armazenamento e de evocação de informações. As teorias que surgiram a fim de explicar esse fenômeno ainda passam por modificações, porém parece ser consenso a ideia de que diferentes subsistemas cognitivos estão envolvidos na sua formação (AFFONSO, 2017).

De acordo com Purves e colaboradores (2011), o critério de classificação dos tipos de memória (Figura 11) depende do período de tempo durante o qual ela permanece efetiva. Dessa forma, uma memória pode ser *imediate*, *de curto prazo* ou *de longo prazo*. No primeiro grupo, as informações ficam retidas no cérebro por alguns segundos, envolvendo todos os sentidos e dando ao indivíduo a sensação de “tempo presente”. Já a memória de curto prazo está relacionada com a habilidade de reter uma informação por alguns segundos ou minutos. Nesse grupo, se encaixa a *memória de trabalho*, responsável por reter a informação por tempo suficiente até a ativação de funções cognitivas mais complexas. Finalmente, a memória de longo prazo seria aquela responsável por armazenar as informações por horas, dias, meses e até mesmo anos (PURVES et al., 2001). Esse grupo se subdivide em *memória explícita*, referente a fatos, eventos, acontecimentos pessoais, e *memória implícita*, evocadas de maneira mais automática, como andar de bicicleta, por exemplo. Dentro da categoria da memória explícita, chamada por alguns autores de memória declarativa, encaixam-se as memórias *episódicas* e *semânticas*, que interagem entre si durante o processo de evocação intencional (AFFONSO, 2017). Como dito anteriormente, esse tipo de memória é o mais comumente afetado pela DA.

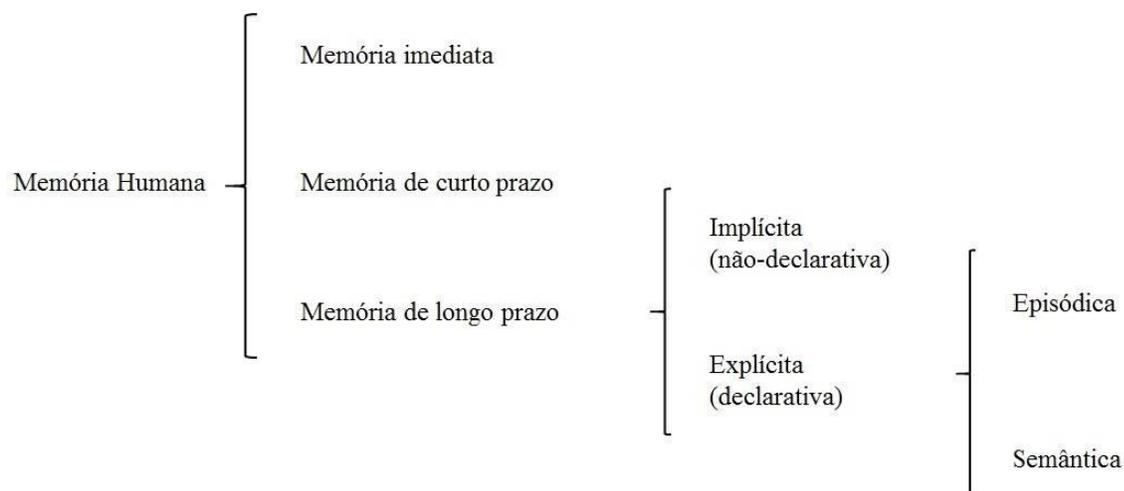


Figura 11: Esquema representativo dos tipos de memória.  
 Fonte: Elaborado pela autora (2019).

O hipocampo, a amígdala e diferentes regiões corticais, incluindo a pré-frontal e a entorrinal, estão envolvidas nos processos de formação da memória declarativa (IZQUIERDO et al., 2013). Nos pacientes com DA, essas áreas cerebrais apresentam-se significativamente mais reduzidas e atrofiadas quando comparadas ao cérebro de idosos saudáveis (YANG et al., 2019), sendo este um motivo provável pelo qual episódios de amnésia são observados nos estágios iniciais da doença.

A habilidade humana de formação da memória de longa duração é dependente de modificações sinápticas estruturais e funcionais observadas ao longo de períodos que podem durar horas, dias ou semanas (IZQUIERDO et al., 2003; IZQUIERDO et al., 2008). O aumento da eficácia sináptica também é conhecido como potencial de longa duração (LTP – do inglês *long-term potentiation*) (SILVÉRIO; ROSAT, 2006). Essas modificações, chamadas de plasticidade neural, incluem a formação de novas sinapses, a neurogênese, e as remodelagens sinápticas e estruturais do cérebro, e envolvem mudanças nos mecanismos de sinalização que envolve a regeneração neural. Todo esse processo torna-se essencial à memória e ao aprendizado, posto que a sinalização por intermédio dos potenciais pós-sinápticos apresenta gastos energéticos muito elevados. Para compensar, o cérebro mantém baixo o número de sinapses. Logo, qualquer dano cerebral capaz de interferir nos mecanismos de regeneração e de modelagem poderá afetar a memória (SUN, 2018).

O mecanismo pelo qual o LTP atua na aquisição da memória já foi descrito previamente. Resumidamente, a mudança eletrofisiológica advinda de um LTP que se observa nas sinapses é

capaz de ativar receptores excitatórios, ocasionando a abertura de canais dependentes de voltagem e entrada de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Enzimas dependentes desses íons fosforilam proteínas envolvidas na transcrição gênica, levando à síntese proteica, no neurônio ativado, daquelas que alteram as funções sinápticas e regulam todo esse processo (IZQUIERDO et al., 2013). O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF – do inglês *brain derived neurotrophic factor*) é uma das principais proteínas envolvidas na modulação do processo descrito acima (BUDNI et al., 2015; GIUFFRIDA; COPANI; RIZZARELLI, 2018; KOWIAŃSKI et al., 2018).

Evidências apontam o sistema colinérgico como um dos sistemas neurotransmissores que modulam o processamento da memória. Um ponto, porém, permanece obscuro e ele se refere a qual papel, de fato, a ACh desempenha no processamento da memória. Anteriormente, foi demonstrado que os níveis extracelulares de ACh encontram-se elevados pelos processos de aprendizado e de memória; que essa elevação é geralmente correlacionada com o tipo de memória e seu tempo de duração e, ainda, que somente a atividade locomotora não seria capaz de explicar esse aumento. Contudo, não existe consenso se a ACh participa, produz ou seria necessária para o processo de memória (PARENT; BAXTER, 2004). Projeções colinérgicas oriundas de diferentes regiões dos núcleos de base cerebrais inervam o córtex e o hipocampo (HASSELMO; SARTER, 2011). Uma vez liberada a ACh na fenda sináptica, a transdução dos sinais acontece pela sua ligação aos receptores nicotínicos e muscarínicos (SHIN; DIXON, 2015). Os receptores ionotrópicos nicotínicos são excitatórios e o subtipo  $\alpha 7$  é abundantemente encontrado no hipocampo. Sua particularidade consiste em ser permeável aos íons  $\text{Ca}^{2+}$ , por outro lado, os receptores muscarínicos subtipos M1 (excitatório), M2 e M4 (inibitórios) são expressos nas membranas pré e pós-sinápticas hipocampais. Enquanto M1, subtipo mais abundante, regula fundamentalmente a excitabilidade neuronal, M2 e M4 modulam a liberação de neurotransmissores (HAAM; YAKEL, 2017).

Muito antes, porém, da demonstração de transmissão colinérgica, já havia evidências de que colinomiméticos e anticolinérgicos afetavam a memória e a aprendizagem (JERUSALINSKY; KORNISIUK; IZQUIERDO, 1997). No início do século passado, por exemplo, as propriedades amnésicas da escopolamina, antagonista muscarínico não-seletivo, já eram demonstradas (GAUS, 1906). Por conta dessa propriedade, a escopolamina tem sido tradicionalmente usada no campo da neuropsicofarmacologia como um padrão de indução de déficits cognitivos relacionados ao envelhecimento e à demência (KLINKENBERG; BLOKLAND, 2010). Em camundongos, a

intervenção induzida pela escopolamina desregula a atividade colinérgica no hipocampo, interferindo nos processos de aprendizagem e de memória (LEE et al., 2018). Além do déficit cognitivo, a molécula pode induzir disfunção colinérgica cerebral e estresse oxidativo (XU et al., 2019). Dessa forma, o uso da escopolamina como um modelo farmacológico de amnésia resultante de déficit colinérgico ganhou popularidade após a hipótese colinérgica (KLINKENBERG; BLOKLAND, 2010) e a sua aplicação em modelos animais difundiu-se como uma estratégia de pesquisa na busca por tratamentos para a DA (LEE et al., 2018).

Segundo Laurijssens; Aaujard; Rahman (2013), o uso de modelos animais no processo de busca pela prevenção e/ou cura da DA é considerado desejado, se não essencial. Sendo assim, diversos modelos além daquele do déficit cognitivo induzido pela escopolamina têm sido desenvolvidos e aprimorados nos últimos anos, conforme resumo apresentado na Tabela 2. Para a condução desse trabalho, foi utilizado o modelo de déficit cognitivo induzido pela administração da escopolamina, conforme descrito na seção “4. Material e métodos”.

Tabela 2: Descrição dos modelos animais utilizados na triagem de novas moléculas para a doença de Alzheimer.

<b>Tipo de Modelo</b>	<b>Ação</b>	<b>Referências</b>
Natural	Animais espontaneamente desenvolvem algumas características neuropatológicas semelhantes à DA	LAURIJSSSENS; AUJARD; RAHMAN, 2013; LANGUILLE et al., 2012
Genético	Utiliza-se da tecnologia transgênica para reproduzir em animais as características patológicas da DA	SASAGURI et al., 2017; HOLM; ALSTRUP; LUO, 2016
Intervencional	Replica-se em animais alguns sinais característicos da DA por meio da administração de fármacos/agentes químicos ou pela indução de lesões em regiões específicas do cérebro.	FACCHINETTI; BRONZUOLI; SCUDERI, 2017; GOTHWAL et al., 2019

Fonte: Elaborado pela autora (2019). DA: doença de Alzheimer.

Como a busca por novos agentes terapêuticos eficazes instigam os pesquisadores e impulsionam às pesquisas, os produtos de origem vegetal representam uma alternativa a ser explorada em doenças, tal como a DA.

## 2.2. RESVERATROL

Os compostos fenólicos representam a classe de metabólitos secundários mais abundantes do reino vegetal e se derivam da fenilalanina, aminoácido aromático proveniente da via do chiquimato (DAI; MUMPER, 2010; CZELUSNIAK et al., 2012). Quimicamente, os polifenóis são caracterizados pela presença de um ou mais anéis aromáticos ligados a um ou mais grupos hidroxila (BIJAK; PONCZEK; NOWAK, 2014), e contribuem para a manutenção de diferentes processos fisiológicos dos vegetais, incluindo a absorção da radiação ultravioleta (RUV) e a redução de espécies reativas de oxigênio (EROs) (TUONG; WALKER; SIVAMANI, 2015). Esses compostos são categorizados em diferentes classes que se diferenciam, principalmente, em função do número de anéis fenólicos presentes, dos grupos substituintes que se ligam a estes anéis, e pelas possíveis ligações que podem fazer com outras moléculas (MATIAS, 2012). Nessa categoria, incluem-se os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos, as ligninas e os estilbenos (MANACH et al., 2004; JUNIOR; TEIXEIRA; MACEDO, 2015).

Os estilbenos são compostos naturais envolvidos nos mecanismos de resistência das plantas a condições de estresse, como ataque de micro-organismos e RUV, por exemplo. Por este motivo, também são chamados de fitoalexinas, do grego *phytos* = planta e *alekein* = defender. Trata-se, geralmente, de compostos pequenos, cujo peso molecular varia entre 210 e 270 g Mol<sup>-1</sup> e cuja estrutura é caracterizada por um esqueleto 1,2-difenil-etileno (Figura 12; KASIOTIS et al., 2013).

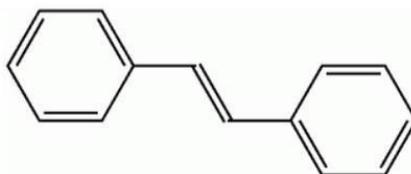


Figura 12: Estrutura química do esqueleto estilbenoide.

Fonte: DOGAN, 2008.



### 2.2.1. Absorção, metabolismo e biodisponibilidade

A molécula de RSV [*Chemical Abstract Service* (CAS) número 501-36-0] apresenta-se como um pó esbranquiçado, de fórmula molecular  $C_{14}H_{12}O_3$ , peso molecular de  $228,25 \text{ g Mol}^{-1}$  e ponto de fusão entre  $253 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $255 \text{ }^\circ\text{C}$  (AMRI et al., 2012). Possui característica lipofílica (coeficiente de partição igual a 3,40), solúvel em etanol ( $\sim 50 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e em dimetilsulfóxido (DMSO;  $\sim 16 \text{ mg mL}^{-1}$ ), porém praticamente insolúvel em água ( $\sim 3 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ ), e possui alta permeabilidade (SOLDATI, 2015). Moléculas que seguem esse perfil são enquadradas na classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (AMIDON et al., 1995).

A biotransformação do RSV acontece tão logo ele atinge o trato gastrointestinal (Figura 14; SPRINGER; MOCO, 2019). Pela via de administração oral, o RSV pode ser absorvido no intestino tanto por difusão passiva quanto pela formação de complexos com transportadores presentes na superfície da membrana (GAMBINI et al., 2015). Nos enterócitos, a molécula passa pelo metabolismo de fase II, produzindo metabólitos polares a partir de reações de conjugação mediadas pelas enzimas uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferases (UDP-glucuronosiltransferase; UGT) e sulfotransferases. As reações de glucuronidação e sulfatação alteram as propriedades biológicas do RSV, e as formas conjugadas do composto e uma pequena fração sob a forma livre podem alcançar o lúmen intestinal via membrana apical ou atravessar a membrana basolateral e alcançar a corrente sanguínea (WANG; SANG, 2018; SPRINGER; MOCO, 2019). Sob a forma livre, o RSV pode se ligar à albumina e às lipoproteínas, incluindo as de baixa densidade (LDL), formando complexos. Estes complexos podem ser dissociados em membranas celulares que apresentam receptores para albumina e LDL, por exemplo, liberando o RSV que pode, então, entrar nas células (GAMBINI et al., 2015).

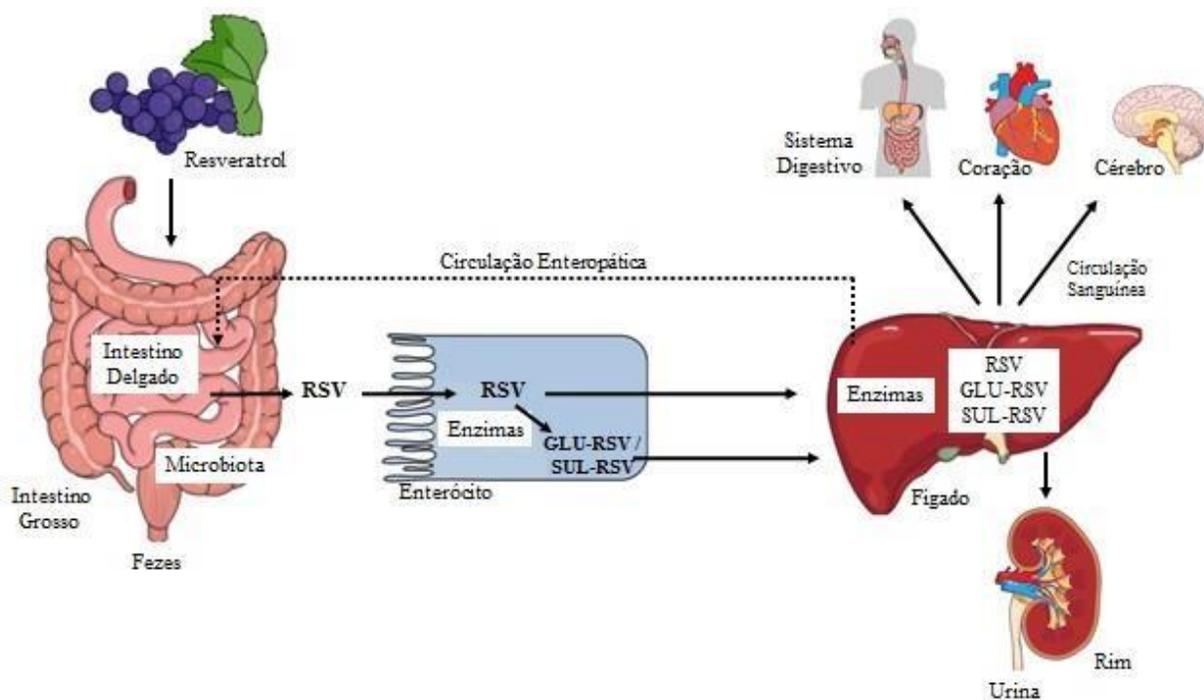


Figura 14: Representação esquemática do metabolismo simplificado do resveratrol. (RSV – Resveratrol; GLU-RSV – forma glucuronídea; SUL-RSV – forma sulfatada).  
Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Partes das frações de RSV conjugadas e livres que alcançam o lúmen intestinal são metabolizadas pela microbiota intestinal, sendo, então, excretadas pelas fezes. Já a outra parte pode ser absorvida e alcançar tanto o fígado quanto outros órgãos e serem, posteriormente, metabolizadas e excretadas. Metabólitos do RSV podem circular do fígado para a bile, atingindo novamente o intestino por meio da circulação enteropática. No intestino delgado, pode ocorrer hidrólise do RSV e dos seus metabólitos antes de alcançarem a circulação portal e serem transportados, novamente, para o fígado (SPRINGER; MOCO, 2019). À circulação enteropática, pode-se atribuir a presença prolongada do RSV e de seus metabólitos na circulação sanguínea (WALLE et al., 2004). A partir do fígado, as formas livres e conjugadas do RSV atingem a circulação sistêmica e são absorvidas pelos tecidos periféricos. Nos rins, pode ocorrer a excreção dos metabólitos polares da molécula (SPRINGER; MOCO, 2019). Vale aqui ressaltar que o metabolismo do RSV, assim como o de outras substâncias químicas, pode ser influenciado pela variabilidade interindividual, por exemplo, polimorfismo genético das enzimas biotransformadoras (RITTER, 2007; UNG; NAGAR, 2007) e por outros fatores, tais como dose, espécie, sexo, tecido e estágio de determinada doença (WANG; SANG, 2018).

Apesar do caráter lipofílico e da sua alta absorção, o RSV apresenta biodisponibilidade extremamente baixa (FRANCO et al., 2012). Fatores como a reduzida solubilidade da molécula em água, isomerização e metabolismo pré-sistêmico rápido e extenso estão relacionados com a baixa distribuição tecidual do RSV (SANTOS et al., 2019), exigindo certa cautela ao extrapolar os efeitos observados *in vitro* para modelos de estudos *in vivo*. Ainda assim, muitos estudos demonstraram a eficácia da molécula em modelos animais. A atividade biológica do composto pode estar relacionada ao processo de recirculação enteropática, seguida da desconjugação e reabsorção dos metabólitos no intestino delgado. Os próprios metabólitos, por sua vez, podem apresentar atividade farmacológica (GAMBINI et al., 2015). Estas possibilidades, no entanto, carecem de maior investigação e representam uma interessante hipótese a ser explorada no que tange à farmacocinética do RSV.

A fim de solucionar a biodisponibilidade reduzida do RSV em humanos, diferentes estratégias têm sido exploradas nos últimos anos. Uma vez classificada como molécula de classe II no SCB (baixa solubilidade e alta permeabilidade), uma pequena alteração na solubilidade poderia melhorar a biodisponibilidade de forma significativa (AMRI et al., 2012). Um exemplo seria o desenvolvimento de sistemas de *drug delivery* capazes de promover uma rápida absorção de uma quantidade considerável do ativo, aumentando a sua concentração plasmática. Formulações orais (NEVES et al., 2013) e tópicas do tipo nanolipídica sólida (OLIVEIRA et al., 2017) e dispersões sólidas (SPOGLI et al., 2018) demonstraram melhora expressiva na solubilidade do RSV, estabilizando a molécula contra a isomerização e melhorando sua biodisponibilidade. Outra abordagem muito empregada é a síntese de novos e potentes análogos do RSV, os quais possuem propriedades farmacocinéticas e biológicas melhores quando comparadas à molécula-líder. São considerados derivados estruturais do RSV moléculas cujas mudanças estejam relacionadas com o tipo, o número e a posição dos substituintes (CHIMENTO et al., 2019).

O investimento em abordagens que visam aumentar a biodisponibilidade e o potencial farmacológico do RSV tem despertado o interesse científico nos últimos anos. Além de ser um composto de origem vegetal, estudos *in vitro* e *in vivo* apontam a molécula como uma possível alternativa para a prevenção e o tratamento de diferentes patologias imunomediadas, neurológicas e neurodegenerativas. O desenvolvimento de sistemas de *drug delivery* ou mesmo derivados

estruturais do RSV representam uma possibilidade de reprodutibilidade em estudos clínicos dos efeitos terapêuticos observados nos ensaios pré-clínicos.

### **2.2.2. Propriedades biológicas**

As características físico-químicas do RSV permitem que a molécula atravesse passivamente as membranas celulares e interaja com receptores presentes nessas membranas, além de ser capaz de interagir com moléculas intra- e extracelulares. Dessa maneira, o RSV pode exercer seu mecanismo de ação por ativação de cascatas de sinalização iniciadas após interação da molécula com receptores de membrana, por ativação de mecanismos intracelulares, ou, ainda, por atuação nos níveis intracelulares (GAMBINI et al., 2015).

Nesta perspectiva, diferentes atividades biológicas já foram atribuídas ao RSV, incluindo ação antioxidante (BASHIR, 2018), anti-inflamatória (YANEZ et al., 2019) e neuroprotetora (QI et al., 2019). Distintos trabalhos científicos demonstraram ainda que, a molécula também apresenta ação antitumoral (KUNDU; SURH, 2008; WANG et al., 2019), cardioprotetora (RIBA et al., 2017), antialérgica (JOHNSON-WEAVER et al., 2018), osteogênica (TSENG et al., 2011), fotoprotetora (OLIVEIRA et al., 2016), e antidiabética (SOUFI et al., 2012).

#### *2.2.2.1. Ação antioxidante*

As EROs e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são constantemente produzidas no organismo a partir de processos endógenos envolvidos no metabolismo aeróbico, e exógenos, os quais incluem agentes ambientais, radiação e exposição a determinados metais (ROLEIRA et al., 2015). Tais espécies participam da manutenção da homeostase celular. Entretanto, quando há excesso na produção de EROs ou deficiência na remoção por meio de sistemas antioxidantes fisiológicos, enzimáticos ou não, origina-se uma condição conhecida como estresse oxidativo (DURACKOVA, 2010; SOLDATI et al, 2018).

O dano oxidativo contribui com a patogenia de diferentes doenças, incluindo as neurodegenerativas (CENINI; LLORET; CASCELLA, 2019). Sendo assim, muito tem sido investigado a respeito dos antioxidantes exógenos, principalmente aqueles de origem vegetal, incluindo o RSV, cujo potencial antioxidante há muito tem sido estudado.

A capacidade antioxidante do RSV depende do arranjo dos grupos funcionais na sua estrutura nuclear. Dessa forma, a configuração *cis/trans*, a substituição e o total de hidroxilas (–

OH), bem como a posição que ocupam na estrutura molecular, influenciam diretamente nos mecanismos pelos quais o composto exerce a sua ação antioxidante (SALEHI et al., 2018). Anteriormente, foi demonstrado que tanto a –OH da posição 4' quanto aquelas posicionadas nos carbonos 3 e 5 (Figura 13) são importantes para a atividade antioxidante do RSV (SZEKERES et al., 2010). Além disso, também foi demonstrado que o *trans*-RSV pode agir de maneira eficiente na neutralização de radicais hidroperoxila ( $\bullet\text{OOH}$ ) (IUGA; ALVAREZ-IDABOY; RUSSO, 2012). Entretanto, a capacidade de captura dos elétrons desemparelhados parece não ser o único mecanismo de ação antioxidante do RSV. A molécula pode atuar, indiretamente, na modulação de cascatas antioxidantes mitocondriais e nucleares (KONYALIOGLU et al., 2013; GAMBINI et al., 2015; SALEHI et al., 2018).

#### 2.2.2.2. Ação imunomoduladora

Os estilbenoides, incluindo o RSV, são polifenóis de caráter ácido que possuem atividade imunomoduladora e anti-inflamatória atuando em diferentes alvos (SALEHI et al., 2018). A inflamação ocorre a partir da secreção de citocinas e quimiocinas, também chamadas de interleucinas (IL). Essas proteínas promovem uma espécie de sinalização intercelular, mobilizando leucócitos da corrente sanguínea para o local da lesão. Ao se ligarem aos seus respectivos receptores de membrana, os monócitos e macrófagos são ativados para eliminarem os patógenos e/ou células danificadas (LANÇOU; FRAZZI; LATRUFFE, 2016).

Recentemente, o RSV demonstrou ser capaz de bloquear, em modelo animal, a indução da expressão de receptores do tipo Toll 4 (TLR4) e do fator nuclear de transcrição (NF- $\kappa$ B), bem como diminuiu os níveis séricos do fator de necrose tumoral (TNF) e da IL-6, a produção de EROs e os níveis da ciclooxigenase (COX)-2 (ZHOU et al., 2017). O TLR4 está associado ao processo de neuroinflamação e, em razão disso, tornou-se alvo terapêutico em potencial. Ainda, o RSV suprimiu significativamente a expressão de TLR4, NF- $\kappa$ B e do grupo de proteínas 1 de alta mobilidade (HMGB1, do inglês *High Mobility Group Box-1*) em modelo de lesão cerebral induzida em ratos (ZHANG et al., 2016), além de impedir a translocação da HMGB1 nuclear para o citoplasma e meio extracelular durante infecção pelo vírus da dengue (ZAINAL et al., 2017). Sabe-se que a interação da HMGB1 com TLR4 é capaz de iniciar uma cascata de sinalização a qual ativa o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, envolvido na regulação da inflamação e na ativação de células imunológicas (SHI et al., 2018).

A molécula de RSV também pode exercer efeito anti-inflamatório via inibição da expressão do óxido nítrico sintase induzida (iNOS), enzima envolvida na produção de óxido nítrico (ON), bem como pode inibir a produção de EROs (COUTINHO et al., 2018). Em ratos, a administração crônica de RSV foi capaz de bloquear a hiperexcitabilidade neuronal por meio da inibição da cascata de sinalização da COX-2 central e periférica (SEKIGUCHI et al., 2016). *Ex vivo*, o RSV também inibiu lesões inflamatórias na cavidade oral (MARTINS et al., 2018).

### 2.2.2.3. Ação neuroprotetora

O sistema nervoso também se beneficia das propriedades farmacológicas do RSV. Estudos prévios já demonstraram a ação neuroprotetora do RSV em DA (SAWDA; MOUSSA; TURNER, 2017; ALKIHOU LI et al., 2019), doença de Parkinson (LIU et al., 2019), esclerose múltipla (GANDY et al., 2019) e doença de Huntington (TELLONE et al., 2015). O estresse oxidativo é um fator comum observado nessas patologias, afetando diversos tipos celulares, especialmente os neurônios (SUN et al., 2010). No entanto, o papel neuroprotetor do RSV parece não estar relacionado somente a sua ação antioxidante e imunomoduladora (SALEHI et al., 2018).

Em 2015, foi demonstrado por Bastianetto; Ménard; Quirion, que um dos mecanismos pelo qual o RSV exerce ação neuroprotetora é a ativação da via de sinalização das sirtuínas (SIRT). As SIRT representam uma classe de deacetilases que, nos últimos anos, emergiram como um potencial alvo terapêutico para o tratamento de doenças neurodegenerativas (ALBANI; POLITO; FORLONI, 2010). Através da sua ação sobre as SIRT, o RSV pode melhorar as funções mitocondriais e a biogênese (SALEHI et al., 2018). Além disso, existem evidências de que a ativação das SIRT pode inibir a via de transcrição do NF- $\kappa$ B, prevenindo a senescência celular, a neurotoxicidade de placas  $\beta$ -amiloides e diminuindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e TNF (XU et al., 2019). Tal efeito se torna particularmente interessante ao considerar a neuroinflamação como fator preponderante na gênese e/ou progressão das doenças neurodegenerativas. Há, ainda, evidências de que as SIRT estejam envolvidas na regulação do processo biológico de estresse oxidativo. A SIRT1, um dos membros da família das SIRT, regula importantes fatores de transcrição, incluindo o fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2, *do inglês nuclear fator erythroid 2-related factor2*) (DO et al., 2014). O Nrf2 induz a transcrição de enzimas antioxidantes, sendo, então, considerado um regulador fundamental do processo antioxidante fisiológico (HAHN; OLIVEIRA; BOCK, 2017).

Em ratos induzidos ao dano colinérgico, a administração intraperitoneal (i.p.) de RSV melhorou o aprendizado espacial e o desempenho no campo aberto, bem como atenuou a imobilidade dos animais (KARTHICK et al., 2016). Além disso, o RSV inibiu a produção e a agregação de  $\beta$ -amiloide em diferentes linhagens celulares, e em modelos animais, preveniu a perda neuronal induzida por placas  $A\beta$ , a morte celular, o acúmulo de produtos provenientes da peroxidação lipídica e, ainda, inibiu a produção de iNOS no hipocampo (REGE et al., 2014).

### 2.2.3. Aza-estilbenos análogos do resveratrol

Na tentativa de melhorar o potencial farmacológico do RSV, nosso grupo de pesquisa tem dedicado esforços na síntese e na avaliação de propriedades biológicas de um novo grupo de análogos do RSV, denominados aza-estilbenos (Figura 15).

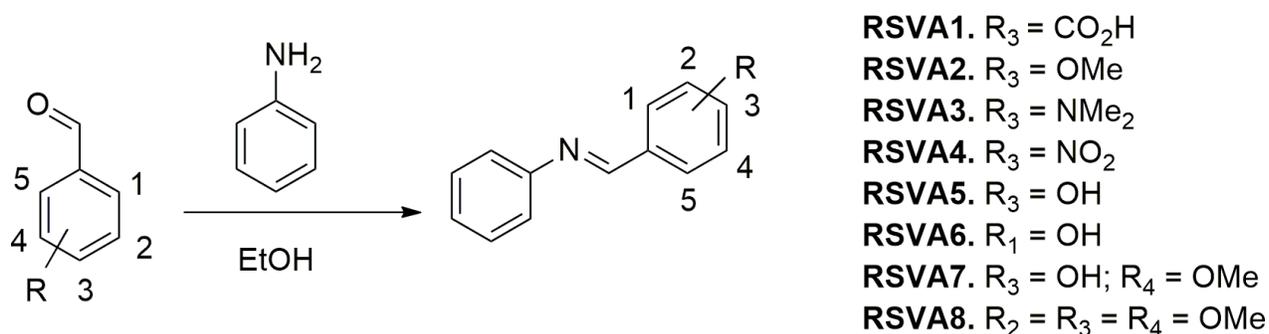


Figura 15: Rota sintética dos derivados aza-estilbenóides do resveratrol.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Anteriormente, esses compostos apresentaram atividade antituberculose (PAVAN et al., 2011), antioxidante (CALIL et al., 2012) e despigmentante (FRANCO et al., 2012). Recentemente, estudos *in silico* e *in vitro* demonstraram a capacidade de interação entre esse grupo de análogos e a enzima AChE (dados ainda não publicados). Motivados por esses resultados, realizou-se protocolos pré-clínicos adicionais objetivando avaliar o potencial neuroprotetor do RSVA6 – molécula com melhor desempenho na inibição *in vitro* da AChE – no modelo de déficit cognitivo induzido pela escopolamina. O presente estudo foi conduzido dentro do contexto epidemiológico que aponta um cenário atual de processo de inversão da pirâmide etária e o envelhecimento populacional como um dos principais fatores de risco para doenças neurodegenerativas, incluindo a DA. Ademais, as estratégias atualmente disponíveis para a abordagem terapêutica da DA ainda

são limitadas e, por este motivo, diferentes grupos científicos ao redor do mundo se dedicam a pesquisar e a desenvolver possíveis alternativas farmacológicas e não farmacológicas. Por conseguinte, mas não menos importante, modular terapêuticamente o sistema colinérgico foi a melhor alternativa até o presente momento, que, de fato, produziu efeitos clínicos durante o desenvolvimento e progressão da DA, ainda que temporários.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. GERAL

Avaliar o efeito neuroprotetor do RSVA6 no modelo experimental de déficit cognitivo induzido pela escopolamina em camundongos.

#### 3.2. ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de RSVA6 pelo método do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH);
- Investigar o efeito do RSVA6 no déficit cognitivo induzido pela escopolamina;
- Avaliar o efeito do RSVA6 na memória de trabalho durante a administração da escopolamina;
- Investigar a ação ansiolítica do RSVA6 durante a administração da escopolamina.
- Investigar o efeito motor do RSVA6 durante o modelo experimental de escopolamina.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MOLÉCULA-TESTE: RSVA6

A partir do trabalho prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa, a molécula RSVA6 apresentou importantes atividades farmacológicas. Uma série de moléculas análogas ao RSV foi sintetizada (PAULA et al., 2013) e submetida a análises *in silico*, cujos resultados demonstraram que as modificações realizadas na estrutura do RSV sugeriam uma melhor interação da RSVA6 com a AChE, quando comparada à molécula-líder. Tal predição se confirmou na análise *in vitro*, cujo ensaio foi conduzido seguindo o método colorimétrico de Ellman (ELLMAN et al., 1961) com algumas modificações já publicadas pelo nosso grupo (LUCAS et al., 2019; ASSIS et al., 2019). A molécula RSVA6 inibiu a enzima em 92,4 % ( $CI_{50} = 2,22 \times 10^{-3}$  M), enquanto o RSV inibiu 56,2% da atividade enzimática ( $CI_{50} = 3,27 \times 10^{-3}$  M), quando comparadas ao padrão fisostigmina (100%;  $CI_{50} = 7,69 \times 10^{-6}$ ).

### 4.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante do RSVA6 foi avaliada pelo método de sequestro de espécies reativas de oxigênio, através da redução do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH; Sigma-Aldrich, EUA), descrito por Sreejayan e Rao (1996), com pequenas modificações. Inicialmente, preparou-se solução de DPPH na concentração de 0,05 mM por meio da pesagem de 1 mg de DPPH que foi solubilizado em 50 mL de etanol grau absoluto (EtOH P.A.; Cromato Produtos Químicos LTDA, Brasil). Na sequência, seguiu-se o preparo da amostra. Foram pesados 2 mg de RSVA6, solubilizados em 2 mL de EtOH P.A. para obtenção de uma solução-estoque inicial de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a partir da qual sucessivas diluições foram realizadas na proporção de 1:2 volume/volume (v/v), utilizando EtOH P.A. como diluente. Em uma microplaca de 96 poços, alíquotas de  $50 \mu\text{L}$  de cada uma das diferentes concentrações de RSVA6 foram adicionadas a  $150 \mu\text{L}$  da solução de DPPH. Ao término do processo, foram obtidas na placa, concentrações teste na faixa de 0,97 a  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O branco da amostra foi preparado com  $150 \mu\text{L}$  de EtOH P.A. e  $50 \mu\text{L}$  da solução-teste, a fim de excluir possível interferência da coloração da amostra. A placa foi cuidadosamente agitada (MicroPlate Genie, Scientific Industries Inc, EUA) e, posteriormente, deixada em repouso, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, por um período de 30 min. Em seguida, foi realizada a

leitura da absorbância em espectrofotômetro (Multiskan GO, EUA) em comprimento de onda fixo de 510 nm. Resveratrol (98% de pureza; JiAherb, China) foi utilizado como controle positivo. Valor de absorbância baixo representa atividade antioxidante frente ao DPPH. A atividade antioxidante foi calculada através da Equação 1:

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{controle}}}{A_{\text{DPPH}}} \times 100$$

Em que:  $A_{\text{amostra}}$  é o valor da absorbância para a solução que contém a amostra mais o DPPH;  $A_{\text{controle}}$  se refere ao valor de absorbância da amostra mais o EtOH; e  $A_{\text{DPPH}}$  representa a absorbância da solução de DPPH.

A porcentagem de atividade antioxidante de cada concentração foi calculada, e a partir da curva concentração-resposta foi possível obter a concentração inibitória de 50% ( $CI_{50}$ ), isto é, a concentração de RSVA6 ( $\mu\text{M}$ ) necessária para consumir 50% dos radicais livres presentes no DPPH. Quanto menor o valor da  $CI_{50}$ , maior potencial antioxidante da amostra.

#### 4.3. ANIMAIS

Neste estudo, duas linhagens de camundongos machos (Ordem Rodentia; Família Muridae; Espécie *Mus musculus*) foram utilizadas. A linhagem *Swiss* foi utilizada para os modelos experimentais de teste do *pellet* enterrado e teste de reconhecimento de objetos. Os animais pesavam, em média, 40 g e a idade aproximada era de 60 dias. Para os testes de campo aberto, realocação de objetos e de labirinto em cruz elevado foram utilizados camundongos C57BL/6, cuja idade aproximada era de 60 dias e o peso médio de 40 g. Esses animais são do tipo *inbred*, isto é, homozigotos gerados a partir do cruzamento sucessivo entre irmãos. Devido à uniformidade genética alcançada com o passar das gerações, a linhagem *inbred* é mais sensível e reage de maneira mais homogênea aos modelos experimentais, tornando possível a utilização de um número menor de animais (MAGALHÃES, 2012). Por outro lado, a obtenção de camundongos C57BL/6 é economicamente mais dispendiosa quando comparada aos animais *Swiss*, sendo este o motivo pelo qual os experimentos aqui descritos foram iniciados com a linhagem *Swiss* e complementados com a linhagem C57BL/6.

Todos os animais utilizados neste estudo foram alojados em pequenos grupos em gaiolas de polipropileno, cobertas com maravalha e com livre acesso à ração e água. Os animais foram mantidos em regime de luz (regime claro/escuro de 12 h; período claro iniciando às 07:00 h) e temperatura ( $21 \pm 1$  °C) controlados. As manipulações ocorreram durante o período de 09:00 h e 16:00 h. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica (DBCA; CONCEA, 2016). Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob o protocolo 3914220319. Os animais foram fornecidos pelo biotério da mesma universidade, e todos os esforços foram utilizados a fim de minimizar o sofrimento, bem como reduzir o número de animais utilizados nos experimentos, pautado pelo princípio dos 3Rs (*Replacement*, *Reduction* e *Refinement*).

#### 4.4. DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais e tratados conforme a Figura 16. O grupo controle foi tratado apenas com solução salina (um estímulo oral e dois intraperitoneais). A escopolamina (ESC) e a rivastigmina (RIVA) foram adquiridas das empresas Sigma-Aldrich (EUA) e Biossintética (Brasil), respectivamente.

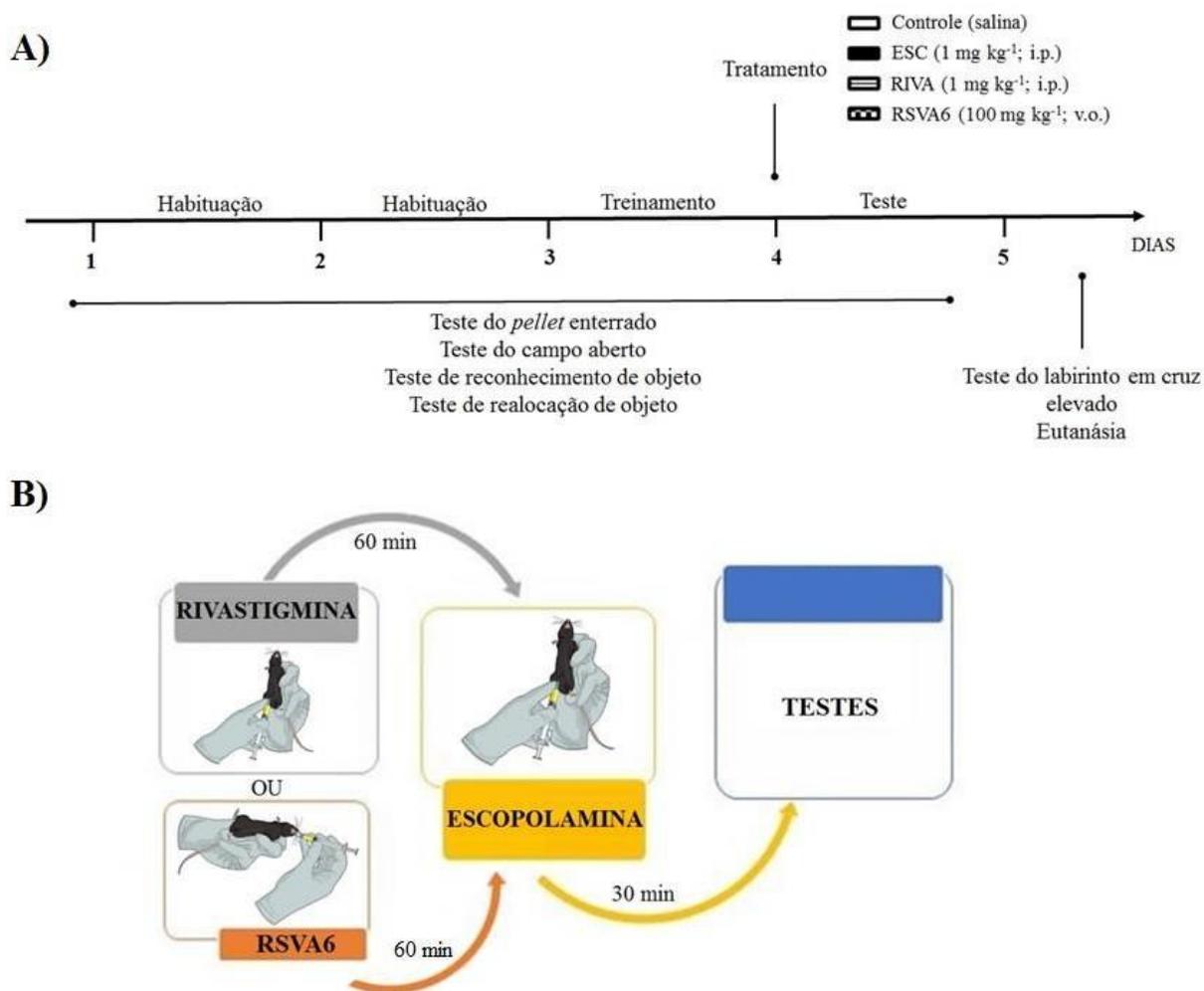


Figura 16: Delineamento experimental dos ensaios *in vivo*. **A)** Distribuição das etapas ao longo da semana. **B)** Sequência cronológica de administração dos tratamentos. ESC: escopolamina; RIVA: Rivastigmina; i.p.: intraperitoneal; v.o.: via oral.  
Fonte: Elaborado pela autora (2019).

## 4.5. TESTES COMPORTAMENTAIS E DE MEMÓRIA

### 4.5.1. Teste do *pellet* enterrado

O objetivo deste protocolo experimental foi avaliar a memória e a capacidade olfativa dos animais. Cada animal utilizado teve o seu peso registrado 48 h antes do experimento e, em seguida, passou por uma restrição alimentar a 90% do peso corporal. Durante este período que antecedeu o teste, foram ofertados a cada animal dois *pellets* de cereal, os quais foram utilizados na avaliação. Os camundongos foram submetidos a um jejum alimentar de 18 h antes do início do treino e

subsequente habituação de 1 h na sala de experimentação comportamental. As gaiolas-teste foram preparadas com 3 cm de maravalha fresca, sendo que em um dos cantos de cada gaiola foi enterrado um *pellet* de cereal a 0,5 cm da superfície (Figura 17). Um único camundongo foi alocado em cada gaiola por vez, e o tempo de latência para que cada animal encontrasse o alimento foi registrado. O treino teve duração de 5 min e para aqueles animais que não encontraram o sedimento, este foi o tempo de latência registrado. No dia seguinte ao treinamento, os camundongos foram submetidos ao protocolo de tratamento e, então, o teste foi realizado da mesma forma que no dia anterior.

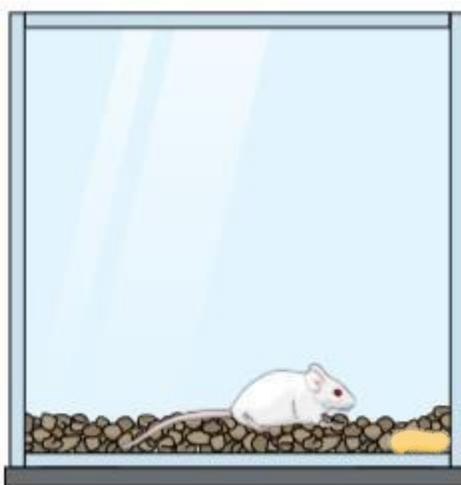


Figura 17: Representação esquemática do animal durante o protocolo de avaliação da memória olfativa avaliada pelo teste do *pellet* enterrado.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

#### 4.5.2. Teste de reconhecimento de objetos (TRcO)

Neste protocolo experimental, foi avaliada a memória de reconhecimento dos animais (Figura 18). Os animais foram, individualmente, acondicionados no campo aberto para habituação durante o tempo de 5 min, por três dias consecutivos. No quarto dia, os mesmos foram colocados sobre a mesma arena, porém com a presença de dois objetos iguais posicionados na mesma linha direcional e distantes 7 cm das paredes da caixa. Nesta sessão de treinamento com duração de 5 min, foi registrado o tempo, em segundos, que cada animal gastou investigando cada um dos objetos. Após 24 h, os animais foram tratados conforme protocolo e, 1 h após foram novamente expostos aos objetos no campo aberto. Entretanto, o objeto menos explorado durante o treinamento foi substituído por uma nova peça. Novamente, o tempo de exploração de cada objeto foi registrado

como no dia anterior, durante o tempo de 5 min. Assim, foram consideradas como atividades exploratórias o ato de cheirar, tocar ou observar o objeto a menos de 2 cm de distância. A função cognitiva foi avaliada em função do índice de discriminação (ID), ou seja, o tempo gasto pelo animal explorando o objeto novo comparado com aquele já familiar. Para efeito de cálculo, utilizou-se  $ID = T_N / (T_N + T_F) \times 100$ , no qual  $T_N$  = tempo gasto explorando o objeto novo e  $T_F$  = tempo gasto explorando o objeto familiar (BHUVANENDRAN et al., 2018). Ao fim de cada sessão, o campo foi limpo com etanol 10%, a fim de minimizar as pistas olfativas deixadas pelos animais anteriores.

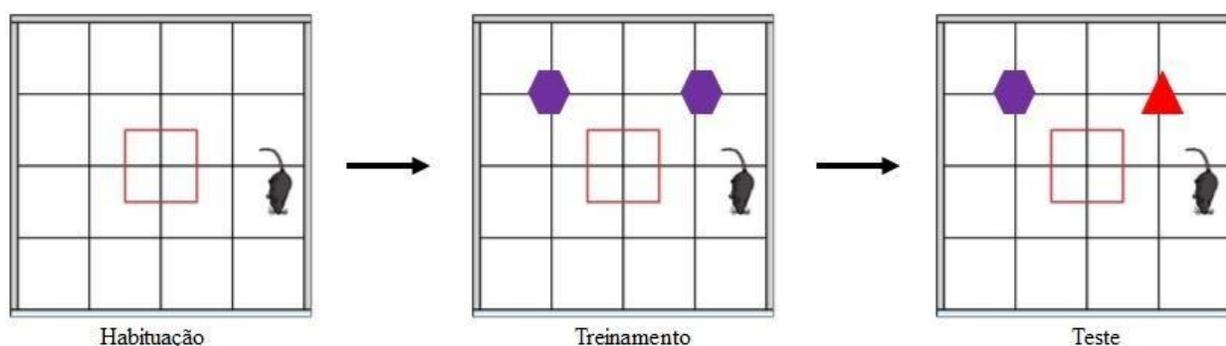


Figura 18: Representação esquemática do protocolo de avaliação da memória de reconhecimento, através do teste de reconhecimento de objeto.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

#### 4.5.3. Teste do campo aberto (TCA)

O teste do campo aberto permite avaliar a ocorrência de possível efeito dos tratamentos nas atividades exploratória e locomotora (RODRIGUES et al., 1996). O teste foi realizado em uma caixa de madeira de dimensões 40 cm x 60 cm x 50 cm, cuja base foi dividida em 12 quadrantes iguais (Figura 19). As condições de luz, temperatura e ruído foram controladas durante todo o procedimento. Os animais foram posicionados no centro do campo, com livre permissão para explorá-lo durante o tempo de 5 min. O número de quadrantes cruzados com as quatro patas foi contabilizado. Ao fim de cada sessão, o aparato foi limpo com etanol 10%.

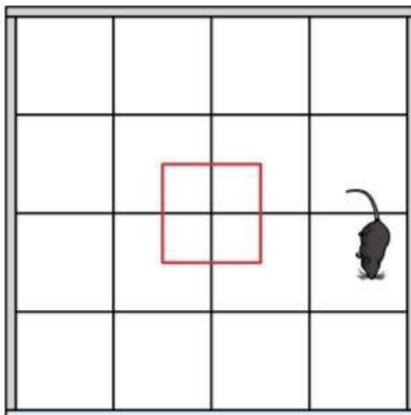


Figura 19: Representação esquemática do animal sob avaliação das atividades exploratória e locomotora no teste do campo aberto.

Fonte: mindthegraph.com.

#### 4.5.4. Teste de realocação de objetos (TRaO)

O teste de realocação de objetos avalia a memória espacial em camundongos e o protocolo experimental encontra-se representado pela Figura 20. Nos dois primeiros dias do protocolo, os animais foram habituados no campo aberto por 5 min e as pistas visuais foram alocadas ao redor do campo, a fim de servirem como guia. No terceiro dia, os camundongos foram novamente treinados no campo aberto pelo mesmo tempo dos dias anteriores, porém com a presença de dois objetos iguais (**A** e **B**), os quais foram posicionados a 12 cm um do outro e a 11 cm da parede da caixa. O tempo que os animais gastaram na exploração de cada objeto foi registrado, seguido do cálculo do tempo médio. No quarto dia, o objeto **A** foi realocado para outro ponto do campo, uma vez que os camundongos gastaram, em média, menos tempo explorando **A** durante o treinamento. Aos animais foi permitida, então, uma nova exploração de 5 min com registro dos tempos de exploração para **A** (realocado) e **B**. Foram consideradas como atividades exploratórias o ato de cheirar, tocar ou observar o objeto a menos de 2 cm de distância. Nesta fase de teste, a memória espacial dos animais foi avaliada pelo cálculo do índice de discriminação (ID), ou seja, o tempo gasto pelo animal explorando o objeto realocado comparado com aquele já familiar. Para efeito de cálculo, utilizou-se  $ID = T_A / (T_A + T_B) \times 100$ , no qual  $T_A$  = tempo gasto explorando o objeto realocado e  $T_B$  = tempo gasto explorando o objeto familiar. O campo e os objetos foram higienizados ao fim de cada sessão com etanol 10%, a fim de minimizar as pistas olfativas deixadas pelos animais anteriores.

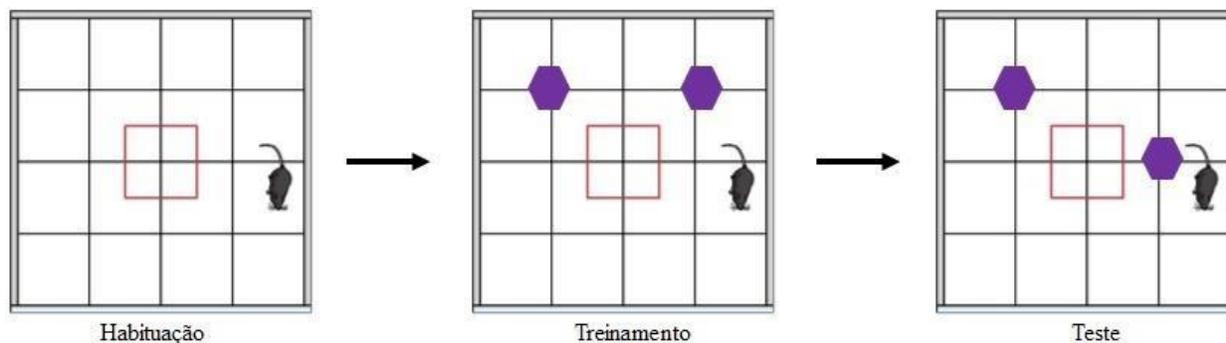


Figura 20: Representação esquemática da avaliação da memória espacial do animal através do teste de realocação de objeto.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

#### 4.5.5. Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado (LCE; Figura 21) baseia-se na aversão natural que os roedores possuem por espaços abertos (SILVA, 2011) e pode ser utilizado para avaliar comportamento motor, exploratório e níveis de ansiedade (AYDIN et al., 2016). O aparato consiste de dois braços abertos apostos (25 cm x 5 cm) perpendiculares a dois braços fechados também opostos (25 cm x 5 cm x 15 cm) que se encontram em uma plataforma central (5 cm x 5 cm), elevados a uma altura de 50 cm do nível do chão. Inicialmente, cada animal foi colocado cuidadosamente na plataforma central do labirinto de frente para o braço aberto, sendo permitida a livre circulação sobre o labirinto durante 5 min. O número de entradas e o tempo gasto em cada braço foram manualmente registrados ao longo desse tempo, sendo que o registro ocorreu somente quando o animal colocou as quatro patas dentro de um dos braços, aberto ou fechado. Os dados coletados serviram como medida de ansiedade.

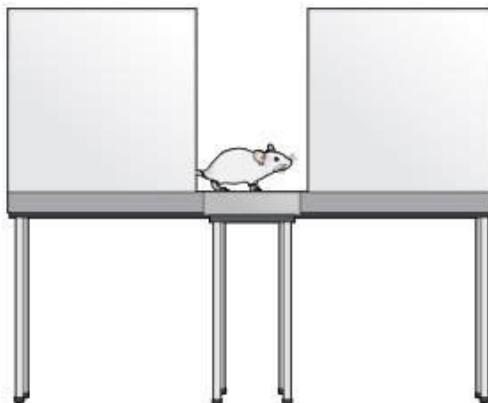


Figura 21: Representação do animal durante o protocolo de avaliação de ansiedade, através do teste do labirinto em cruz elevado.

Fonte: mindthegraph.com.

#### 4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Os resultados foram submetidos à análise de variância (uma- ou duas-vias ANOVA), a fim de analisar as diferenças entre os grupos experimentais, e  $p < 0,05$  foi definido como estatisticamente significativo. As análises foram realizadas com o auxílio do *software* Prism® versão 6.0 (GraphPad Software Inc., USA).

### 5. RESULTADOS

#### 5.1. RSVA6 APRESENTOU AÇÃO ANTIOXIDANTE INFERIOR AO RESVERATROL

A avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH é um método colorimétrico simples que avalia a habilidade do composto testado em neutralizar o radical livre que se encontra desemparelhado na molécula do DPPH. Sob a forma de radical, o DPPH possui coloração violeta e absorvância na faixa de 510-520 nm. Quando reduzido, o DPPH adquire coloração amarela e, conseqüentemente, ocorre um decréscimo da absorvância (ALVES et al., 2010). De maneira geral, a presença de grupos  $-OH$  na estrutura básica dos compostos confere maior capacidade de neutralização de radicais livres (SOLDATI, 2015).

O Gráfico 1 apresenta o perfil antioxidante do RSV e do RSVA6 no protocolo utilizando o DPPH. O RSV apresentou uma relação de inibição dose-dependente, ou seja, quanto maior a concentração do composto, maior a neutralização do DPPH. Na faixa de concentração que variou de 0,9 a 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a porcentagem de atividade antioxidante do estilbeno variou de 30% a 90%. Além disso, foi possível demonstrar a ação do RSV por meio da sua concentração efetiva ( $CE_{50}$ ), ou seja, a concentração do composto necessária para neutralizar 50% dos radicais de DPPH disponíveis no meio reacional. A partir da equação da reta obtida ( $y = 4,36x + 25,32$ ;  $R = 0,96$ ), obteve-se uma  $CE_{50} = 5,66 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

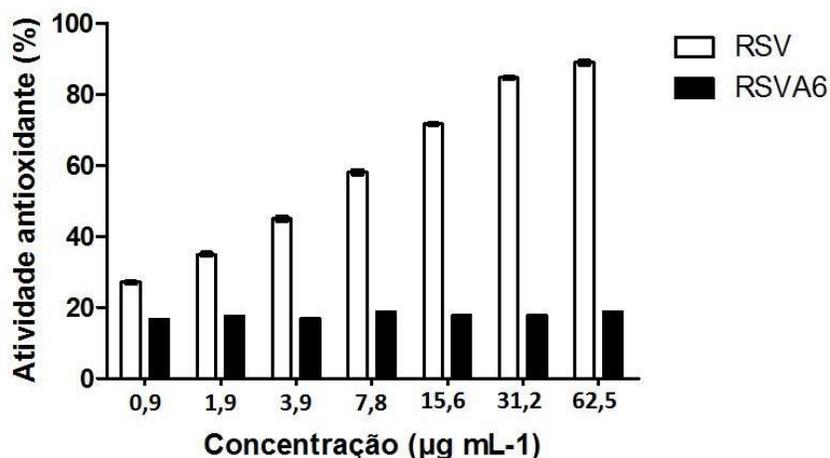


Gráfico 1: Atividade antioxidante do resveratrol e do RSVA6 pelo método do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n = 3).

O derivado RSVA6 apresentou uma relação não linear entre a concentração do composto vs. a atividade antioxidante. A partir do Gráfico 1, observa-se que RSVA6 apresentou inibição igual ou abaixo de 20%, independente da sua concentração em solução. A não linearidade impossibilitou o cálculo da  $CE_{50}$  do análogo. Dessa maneira, fica demonstrado que a alteração na estrutura do RSV que deu origem ao derivado RSVA6 implicou na redução da atividade antioxidante da molécula.

## 5.2. EFEITO NEUROPROTETOR DO RSVA6 NO MODELO EXPERIMENTAL DE DÉFICIT COGNITIVO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE ESCOPOLAMINA

### 5.2.1. Pré-tratamento com RSVA6 preveniu disfunção sensorial olfativa

O teste do *pellet* enterrado avalia a memória olfatória relacionada à motivação alimentar, já que avalia a habilidade dos animais advindos de um regime de restrição nutricional em detectar um *pellet* de cereal enterrado na maravalha (LEHMKUHL; DIRR; FLEMING, 2014). O tempo de latência é o principal parâmetro avaliado no teste, representando o período entre o momento o qual o animal foi colocado na gaiola até o instante em que ele encontrou o *pellet* (YANG; CRAWLEY, 2009). O Gráfico 2 ilustra que não houve diferença significativa no tempo de latência durante o período de treino ( $P > 0,05$ ). Em contrapartida, no período de teste, o grupo ESC ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ; i.p.) apresentou tempo significativamente maior ( $P < 0,01$ ) quando comparado ao grupo controle para encontrar o *pellet* enterrado. Esse resultado indica o potencial do bloqueador muscarínico em

induzir anosmia nos animais, indicando que o modelo experimental empregado foi capaz de induzir uma disfunção sensorial olfativa nos animais. Interessantemente, o grupo tratado com RSVA6 (100 mg kg<sup>-1</sup>; v.o.), administrado 60 min antes da ESC, apresentou latência significativamente menor ( $P < 0,01$ ) quando comparado aos animais do grupo ESC, semelhante aos animais tratados com RIVA (1 mg kg<sup>-1</sup>; i.p.) – fármaco comercialmente utilizado para o tratamento da DA e, utilizando como controle positivo. Em conjuntos, estes resultados sugerem uma ação neuroprotetora do RSVA6, visto que a molécula preservou as habilidades olfativas dos animais após a administração da escopolamina.

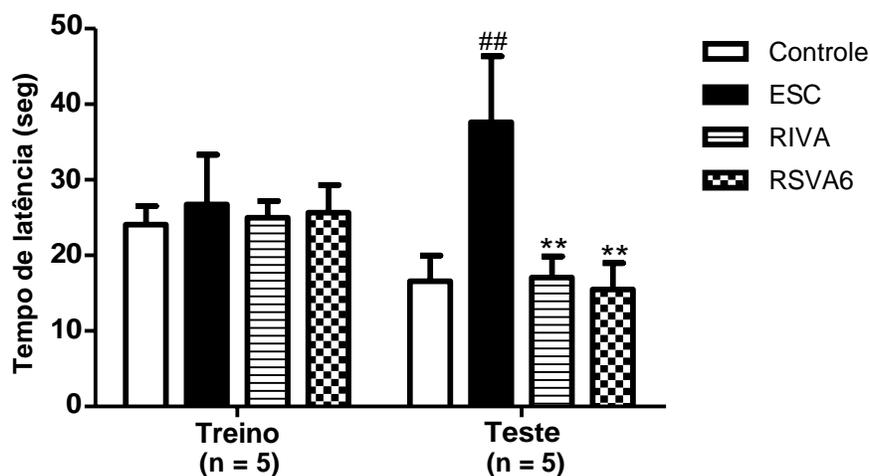


Gráfico 2: Pré-tratamento com RSVA6 preveniu disfunção sensorial olfativa. Todos os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. ANOVA de duas-vias seguido do pós-teste de Bonferroni. Valores de <sup>##</sup> $P < 0,01$  comparado com grupo controle e <sup>\*\*</sup> $P < 0,01$  comparado com grupo ESC. ESC: escopolamina; RIVA: rivastigmina.

### 5.2.2. Efeito neuroprotetor de RSVA6 na memória de reconhecimento

O TRcO baseia-se no conceito de que roedores possuem uma preferência inata por novidade, e por isso tendem a explorar por mais tempo um objeto novo quando comparado à objeto familiar (SORIAL; SAYED, 2017). Na fase de treinamento (Gráfico 3A) não se observou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) no índice de discriminação (ID) entre os grupos, ou seja, não houve preferência por nenhum dos dois objetos idênticos aos quais os animais foram expostos.

O gráfico 3B ilustra que uma única dose de ESC (1 mg kg<sup>-1</sup>; i.p.) resultou na diminuição significativa da exploração do novo objeto em comparação com aquele já familiar, quando comparado com o grupo controle ( $P < 0,01$ ). A administração prévia de RSVA6 (100 mg kg<sup>-1</sup>; v.o.) bloqueou significativamente a perda da memória de reconhecimento induzida pela

administração de ESC ( $P < 0,01$ ), similarmente o grupo tratado com rivastigmina (RIVA  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

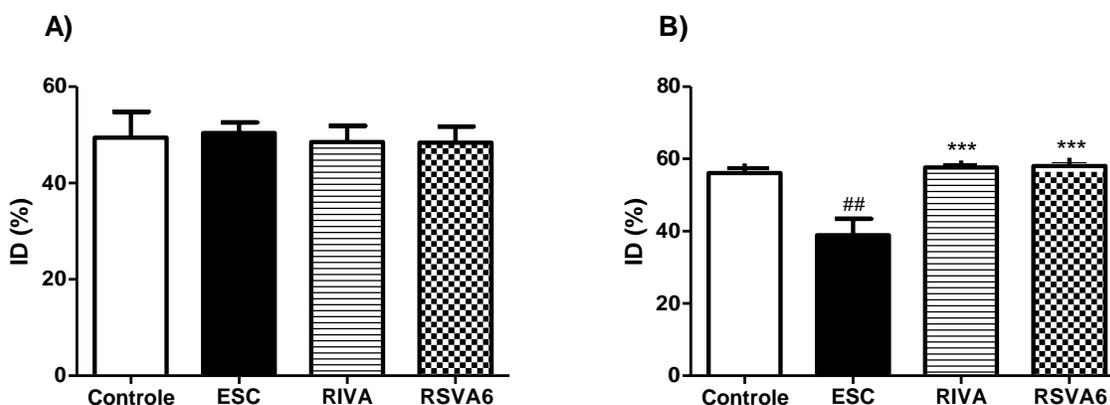


Gráfico 3: Efeito do RSVA6 no déficit cognitivo induzido pela escopolamina em camundongos *Swiss* no teste de reconhecimento de objeto. A) período de treino. B) período de teste. Todos os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média,  $n = 10$  em cada grupo. Valores de ## $P < 0,01$  comparado com grupo controle e \*\*\* $P < 0,001$  comparado com grupo ESC. ID: índice de discriminação; ESC: escopolamina; RIVA: rivastigmina.

### 5.2.3. RSVA6 não interferiu na atividade locomotora dos animais

O TCA foi utilizado a fim de excluir possível dano motor do RSVA durante o protocolo experimental utilizado. O Gráfico 4 ilustra que o tratamento dos animais com RSVA6 não induziu alterações locomotoras, particularmente, no número de quadrantes percorridos nos períodos que abrangeram a habituação, o treino e o teste, eliminando assim a interferência motora na função cognitiva dos roedores.

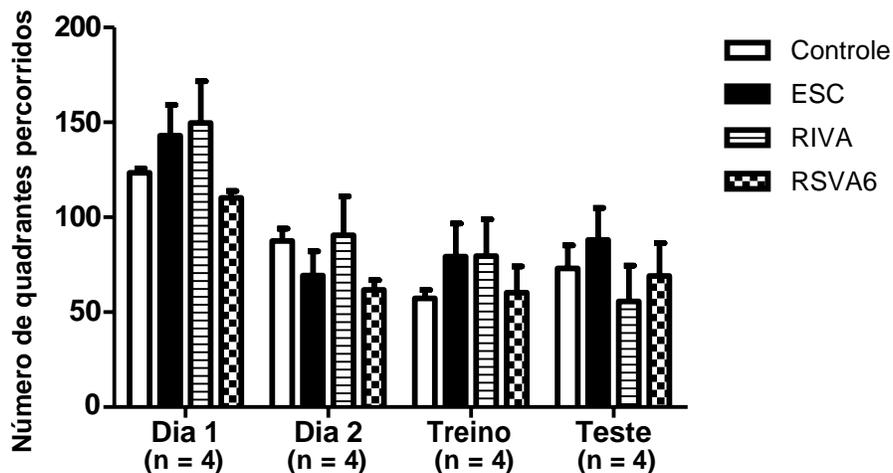


Gráfico 4: Avaliação da atividade locomotora dos animais da linhagem C57BL/6, avaliada no teste do campo aberto. Todos os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Não houve diferença significativa entre os grupos. ESC: escopolamina. RIVA: rivastigmina.

#### 5.2.4. Efeito neuroprotetor do RSVA6 na memória espacial de curto prazo

Os efeitos de RSVA6 na memória espacial foi avaliada pelo TRaO (Gráfico 5). Na fase de treinamento, não foram observadas diferenças significativas no tempo de exploração dos objetos A e B entre os diferentes grupos ( $P > 0,05$ ; Gráfico 5A), excluindo assim a existência de preferência dos respectivos animais. Na fase de teste, conforme indicado no Gráfico 5B foram observadas diferenças significativas no ID entre os grupos experimentais. O ID foi expresso como a proporção do tempo total gasto pelos animais explorando os objetos e representa, neste caso, a diferença do tempo de exploração entre o objeto realocado e objeto familiar. Conforme esperado, análises *post hoc* de comparações múltiplas demonstraram que o grupo tratado apenas com ESC ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) apresentou uma diminuição significativa no ID quando comparado ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). Por outro lado, o pré-tratamento com RSVA6 ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) reverteu o déficit cognitivo quando comparado ao grupo ESC ( $P < 0,05$ ). Esta ação foi similar à resposta observada nos grupos controle e controle positivo (RIVA  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ), indicando o efeito neuroprotetor do derivado, por meio da facilitação dos processos de aprendizagem e memória, mesmo na presença de déficit cognitivo.

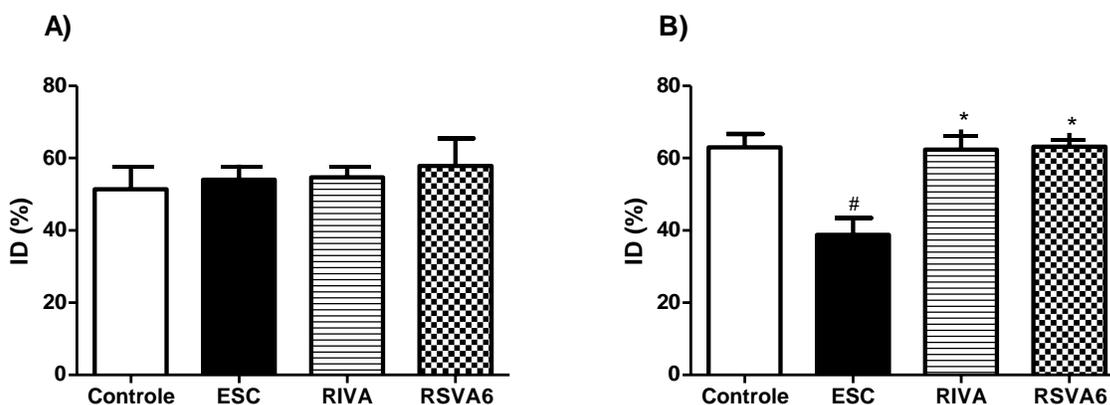


Gráfico 5: Efeito do RSVA6 no déficit cognitivo induzido pela escopolamina em camundongos C57BL/6 no teste de realocação de objeto. A) período de treino. B) período de teste. Todos os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média,  $n = 4$  em cada grupo. Valores de # $P < 0,05$  comparado com grupo controle e \* $P < 0,05$  comparado com grupo ESC. ID: índice de discriminação; ESC: escopolamina; RIVA: rivastigmina.

### 5.2.5. RSVA6 não alterou o nível de ansiedade dos animais após a administração da escopolamina

O LCE pode ser utilizado para avaliar padrões comportamentais em roedores que incluem a capacidade exploratória, aprendizado, memória e ansiedade (YADAV et al., 2019). Assim, cada animal foi posicionado no ponto de interseção entre os braços do aparato, direcionados ao braço aberto. O número de entradas em cada braço (aberto e fechado), bem como o tempo de permanência em cada um deles serve como parâmetros de medida indireta de ansiedade (FOX; TORIGOE; BUTCHER, 2018), visto que existe uma preferência natural dos animais por áreas fechadas, ao mesmo tempo em que são instigados pela curiosidade inata a explorar o braço aberto. O Gráfico 6 demonstra que não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos com relação ao número de entradas nos braços fechados (Gráfico 6A), bem como ao tempo de permanência (Gráfico 6B) em cada um dos braços.

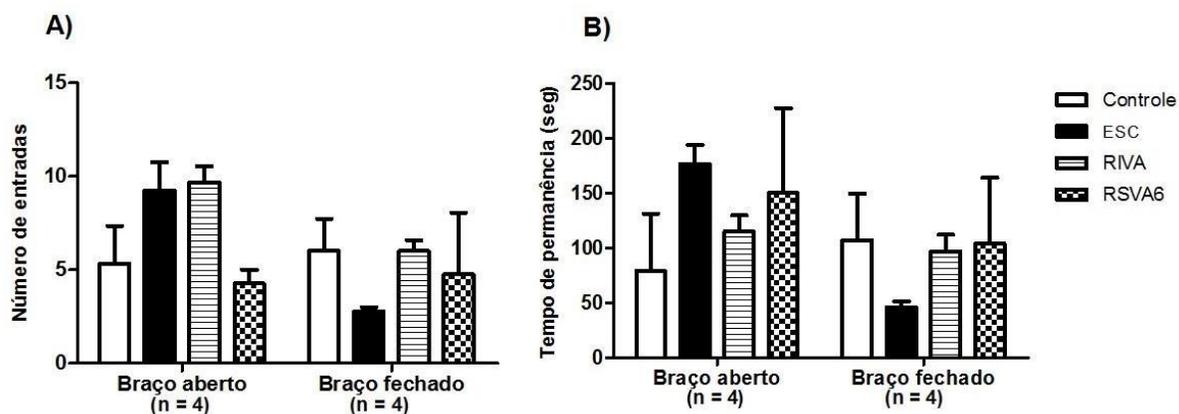


Gráfico 6: Avaliação do perfil de ansiedade de camundongos C57BL/6, através do labirinto em cruz elevado. Todos os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Não houve diferença significativa entre os grupos. ESC: escopolamina; RIVA: rivastigmina.

## 6. DISCUSSÃO

A DA é uma patologia neurodegenerativa caracterizada pela perda progressiva da memória e pelo declínio das habilidades intelectuais, incapacitando o paciente a desempenhar suas atividades diárias (KIM et al., 2016). Apesar de ainda não haver uma completa resposta no que tange as bases moleculares envolvidas no surgimento e evolução da doença, a ciência parece cada vez mais entender a DA como uma combinação de diferentes afecções, e essa visão implica na ideia de que não há, necessariamente, uma única origem para as alterações observadas (NEFF, 2019).

Espécies reativas de oxigênio são produzidas continuamente pelo organismo durante os processos bioquímicos naturais do corpo. Em concentrações fisiológicas participam da homeostase celular (GULÇIN, 2010) e na regulação de processos metabólicos da musculatura esquelética (NEMES et al., 2018). As EROs são potentes indutoras do sistema antioxidante enzimático. No entanto, o desequilíbrio redox pode desencadear um quadro de estresse oxidativo (COUGHLIN, 2018), contribuindo com a fisiopatologia de doenças crônicas, incluindo a DA (LIGUORI et al., 2018). A membrana cerebral é composta por ácidos graxos poli-insaturados, tornando esse órgão particularmente vulnerável ao ataque por EROs. Além disso, as placas  $A\beta$  possuem sítios de alta afinidade para o cobre e o zinco – biometais envolvidos nos processos oxidativos (HUANG; ZHANG; CHEN, 2016).

As atividades farmacológicas do RSV têm sido amplamente estudadas ao longo dos anos, e dentre as ações protetoras do composto incluem-se a redução do estresse oxidativo, a captura de radicais livres e a melhora na atividade das enzimas antioxidantes (KHALID et al., 2018). Uma vez que os antioxidantes são, em essência, agentes redutores, pode-se inferir que a abstração do hidrogênio é o principal mecanismo de ação de moléculas como o RSV. Em consonância, estudos prévios demonstraram que o número de grupos  $-OH$  e a posição que ocupam na molécula, bem como a dupla ligação característica do núcleo estilbeno estão diretamente relacionados a maior ou menor ação antioxidante. Stivala e colaboradores (2001) compararam a atividade antioxidante do RSV sob a forma *trans* (I) e *cis* (II) com os derivados 3,5dihidroxi-4'-metoxiestilbeno (III), 3,5-dimetoxi-4'-hidroxiestilbeno (IV), 3,4',5-trimetoxiestilbeno (V), e  $\alpha,\beta$ -dihidro-3,4',5-trihidroxiestilbeno (VI), representados na Figura 22.

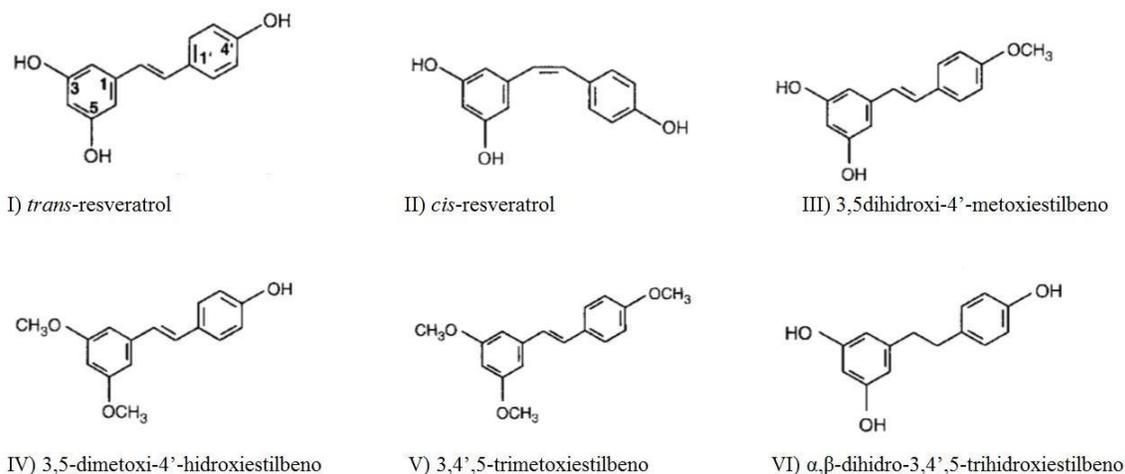


Figura 22: Estruturas químicas do resveratrol e seus derivados utilizados no estudo de Stivala e colaboradores (2001).

Fonte: Adaptado de STIVALA et al., 2001.

Assim, os autores concluíram que as formas *cis* e *trans* não foram significativamente diferentes quanto ao potencial antioxidante. Muito embora, o derivado III apresentou uma redução da ação atribuída à presença do grupamento metil ( $-\text{CH}_3$ ) na posição 4'. A manutenção da  $-\text{OH}$  na posição 4' do análogo IV conferiu à molécula ação antioxidante, apesar da presença dos grupamentos  $-\text{CH}_3$  nas posições 3 e 5. O análogo V não exerceu nenhuma atividade antioxidante, enquanto o composto VI, cuja dupla ligação característica do núcleo estilbeno foi removida, exibiu uma ação cinco vezes menor que o RSV. A partir de tais resultados, os autores concluíram que a  $-\text{OH}$  presente na posição 4' é determinante para a ação antioxidante do RSV, e que a presença da dupla ligação parece atuar sinergicamente nesse efeito (STIVALA et al., 2001).

Conclusão semelhante foi alcançada por Storniolo e Moreno (2018), os quais propuseram uma série de mudanças na estrutura do RSV, dentre as quais a mudança no número de grupos  $-\text{OH}$  nos anéis aromáticos, a substituição de  $-\text{OH}$  por  $-\text{CH}_3$  ou halogênios e a alteração das posições dos substituintes na estrutura molecular. Utilizando a metodologia do 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico (ABTS), demonstraram que a atividade antioxidante foi mantida naqueles derivados cujo grupo  $-\text{OH}$  foi mantido, principalmente na posição *orto* do anel aromático.

Os dados aqui obtidos são consistentes e, particularmente, contribuem com os estudos supracitados. Comparado com a estrutura química do RSV, o RSVA6 possui apenas um

grupamento –OH localizado na posição *orto* do anel aromático B (Figura 23). Apesar da não obtenção de uma curva de relação dose-dependência, ao contrário do que foi observado para o RSV, o RSVA6 exibiu percentual de inibição do DPPH próximo de 20%. Baseado nos estudos de Stivala e colaboradores (2001) e Storniolo e Moreno (2018), pode-se inferir que tal atividade resulta da –OH na estrutura do análogo. Entretanto, segundo Szekeres e colaboradores (2010), um maior número de grupamentos –OH nos anéis fenólicos dos estilbenos é proporcional ao aumento da capacidade de captura de radicais livres, além de melhorar a atividade citostática da molécula. No RSV, os grupos –OH posicionados nos carbonos 3 e 5 do anel benzênico A parecem agir de maneira sinérgica com a –OH do carbono 4' (STIVALA et al., 2001). Na estrutura do RSVA6, porém, não existem grupos –OH no anel benzênico A, o que justificaria o pequeno percentual de inibição da molécula quando comparada com RSV.

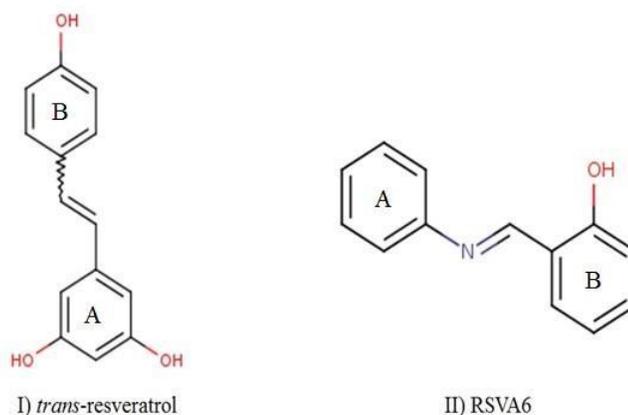


Figura 23: Representação da estrutura química do *trans*-resveratrol e do seu análogo RSVA6.  
Fonte: Marvinjs.chemaxon.

Além das alterações dos grupos substituintes e da posição que estes ocupam na estrutura molecular, outra estratégia que poderia melhorar a ação antioxidante do RSV seria a substituição da ligação C = C por N = C, gerando os análogos imina do RSV. Lu e colaboradores (2012) submeteram uma série de 25 análogos do RSV ao teste do DPPH e constataram que os derivados que, além do grupo –OH na posição *orto* do anel B mas também possuíam a ligação N = C, demonstraram atividade antioxidante superior àquela apresentada pela molécula-líder. Uma possível explicação seria o fato de ocorrer uma ligação entre o hidrogênio da –OH e o átomo de nitrogênio (N), já que este possui um par de elétrons. Como demonstrado pela Figura 23, a molécula de RSVA 6 possui dois parâmetros que a literatura científica aponta como sendo

essenciais para o desempenho da atividade antioxidante. Baseado nesses estudos, é possível inferir que a ausência de grupos –OH no anel A de RSVA6 sejam responsáveis pela diminuição significativa, quando comparada com o RSV. No entanto, a presença do grupo –OH em posição *orto* no anel B e da ligação N = C conferiram ao RSVA6 atividade antioxidante parcial. No contexto deste trabalho, uma ação antioxidante parcial não possui peso negativo, visto que o principal objetivo do estudo foi a investigação do efeito neuroprotetor de RSVA6. Assim, a inibição em torno dos 20% na máxima concentração testada ( $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), é uma potencialidade adicional no conjunto de dados aqui apresentados.

Se, por um lado, a abstração de dois grupos –OH da estrutura de RSVA6 pôde conferir à molécula menor desempenho antioxidante, é possível que essa estratégia esteja relacionada a maior estabilidade metabólica do composto quando comparado ao RSV. Após administração oral em humanos, cerca de 80% do RSV é absorvido, valor considerado elevado para um polifenol de fonte dietética e de baixa solubilidade aquosa (WALLE, 2011). Porém, devido ao rápido e extensivo metabolismo que o composto sofre no intestino e no fígado, sua biodisponibilidade oral varia entre 5% (PEÑALVA et al., 2018) e 1% (SERGIDES et al., 2015, SUMMERLIN et al., 2015; ).

Glucuronosiltransferases e sulfotransferases, enzimas envolvidas nas reações de metabolismo de fase II, desempenham papel crucial na biotransformação do RSV. A conjugação da molécula a sulfatos e glucuronídeos aumenta a solubilidade aquosa do RSV, reduz seu influxo pelas membranas e aumenta a sua taxa de eliminação (SMOLIGA; BLANCHARD, 2014). Resveratrol-3-O-glucuronídeo e resveratrol-4'-O-glucuronídeo (Figura 24) têm sido descritos como os principais glucuronídeos do RSV (BRILL et al., 2006). De acordo com Wang e Sang (2018), as enzimas do complexo UGT catalisam a conjugação do RSV nos grupamentos –OH que ocupam a posição 3 e 4' na estrutura do composto, sendo que parece haver uma preferência pela formação de resveratrol-3-O-glucuronídeo.

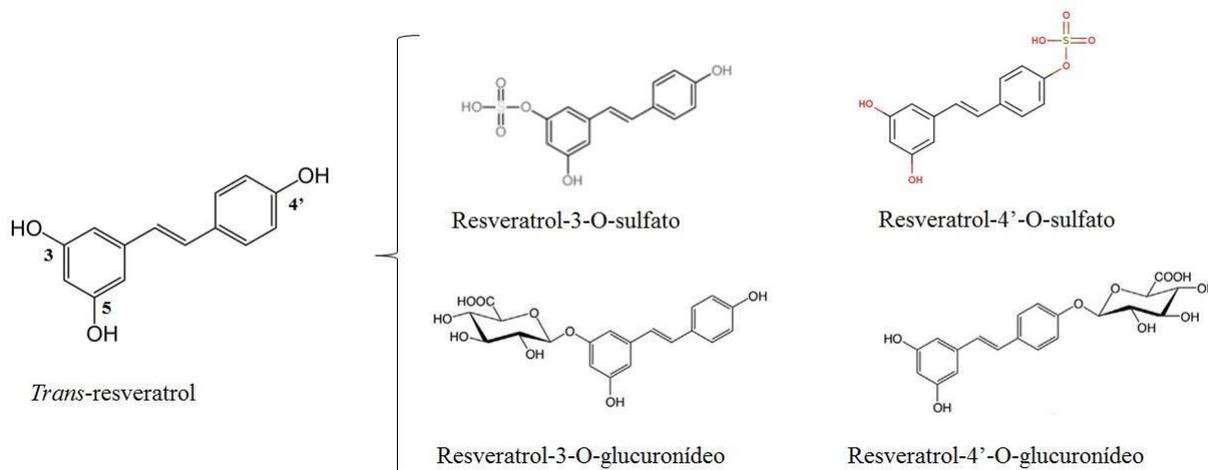


Figura 24: Estruturas químicas do resveratrol e seus principais metabólitos.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

A sulfatação é outra rota metabólica envolvida na biotransformação do RSV. Enzimas sulfotransferases humanas (SULT) catalisam a transferência do átomo de enxofre (S) para o grupo 3-OH e 4'-OH, gerando três principais metabólitos: resveratrol-3-O-sulfato, resveratrol-4'-O-sulfato e resveratrol-3,4'-O-sulfato (Figura 24; MIKSITS et al., 2005). A reação de sulfatação ocorre de forma extremamente rápida nos enterócitos e hepatócitos, sendo esse fator limitante na biodisponibilidade do RSV (CHIMENTO et al., 2019). Além disso, a detecção de conjugados sulfatados no plasma tanto após administração oral quanto intravenosa permitiu a conclusão de que a sulfatação seja, provavelmente, a principal rota metabólica do RSV (WALLE, 2011). De maneira semelhante ao que ocorre na glucuronidação, parece haver uma preferência das SULT pelas posições 3-OH e 4'-OH (MIKSITS et al., 2005; WALLE, 2011; WANG; SANG, 2018).

Os dados científicos, atualmente disponíveis, a respeito do metabolismo do RSV permitem sugerir que o RSVA6 teria maior biodisponibilidade. Isso porque foram abstraídas da estrutura de RSVA6 os grupos -OH das posições 3 e 4' – os principais sítios para o metabolismo de fase II. Ainda, a possibilidade de ocorrer uma ligação de hidrogênio entre os átomos de N e de H presentes na molécula de RSVA6 impediria, em um primeiro momento, a conjugação imediata da única -OH mantida na estrutura de RSVA6. Além da alteração estrutural, os dados aqui apresentados demonstram que o RSVA6 foi capaz de reverter/prevenir efetivamente o déficit cognitivo induzido pela escopolamina, e, possivelmente, tal efeito não seria reproduzido pelo RSV. Apesar da ausência de um grupo RSV no protocolo experimental, Rachna e colaboradores (2012) avaliaram os efeitos do estilbeno em camundongos induzidos ao déficit cognitivo. Durante 21 dias, dois

grupos de animais receberam uma dose de 10 mg kg<sup>-1</sup> ou 20 mg kg<sup>-1</sup> de RSV (i.p.). Após esse período, o dano cognitivo foi induzido via administração de ESC (1 mg kg<sup>-1</sup>; i.p.) 30 min antes do início da avaliação da memória e aprendizado, avaliadas no LCE, esQUIVA passiva e labirinto aquático de Morris. Contrariando as evidências *in vitro* que destacam o potencial neuroprotetor do RSV, o composto não foi capaz de prevenir/reverter o déficit induzido pelo antagonista muscarínico. Os resultados deste presente trabalho, ao contrário, sugerem o potencial neuroprotetor da administração de uma única dose de RSVA6 (100 mg kg<sup>-1</sup>; v.o.), 60 min antes de administrar a ESC (1 mg kg<sup>-1</sup>; i.p.). Nesse contexto, retornamos à hipótese de que o RSVA6 seja metabolicamente mais estável, devido à abstração dos grupos –OH, mesmo quando administrado oralmente. Menor metabolismo sugere maior biodisponibilidade. Sendo assim, RSVA6 desponta como um derivado possivelmente mais potente que o RSV, apesar da necessidade da condução de novos estudos de biodisponibilidade a fim de confirmarmos essa hipótese.

As evidências científicas disponíveis até o momento sugerem hipotetizar uma maior biodisponibilidade de RSVA6, quando comparado ao RSV, devido às alterações estruturais propostas. Estudos conduzidos anteriormente em nosso núcleo de pesquisa demonstraram a superioridade de RSVA6 em inibir a enzima AChE (92,4%) quando comparado à molécula-líder (56,2%; dados ainda não publicados). Por conseguinte, os ensaios *in vivo* apresentados neste presente trabalho foram realizados a fim de investigar o efeito neuroprotetor de RSVA6, sugerindo a molécula como potencial candidata a estudos adicionais voltados para o manejo da DA.

Os efeitos de RSVA6 sobre o déficit cognitivo induzido pela administração intraperitoneal de escopolamina foram avaliados. Este fármaco (escopolamina) age bloqueando os receptores colinérgicos de forma não-seletiva, associando-se à disfunção colinérgica que, por sua vez, interfere nos processos de aprendizado e de memória (BHUVANENDRAN et al., 2018) a curto e a longo prazo (LIN et al., 2016). Previamente, análises teciduais demonstraram que os níveis de ACh encontravam-se significativamente reduzidos em tecidos cerebrais de camundongos que receberam o fármaco (LEE et al., 2018), contrastando com o aumento da atividade da AChE nestes animais (LEE et al., 2018; MUSHTAQ; ANWAR; AHMAD, 2018). Além disso, iAChE podem atenuar o dano cognitivo induzido pela escopolamina por meio do aumento da concentração de ACh (LIN et al., 2016). Apesar deste modelo conter algumas limitações, como a ausência de aspectos patológicos e a possível participação de outros sistemas neurotransmissores na progressão da DA (CHEN et al., 2018), a semelhança entre a alteração induzida pela escopolamina em animais

e os sintomas observados nos estágios iniciais da doença fizeram deste um protocolo validado e amplamente aceito como um padrão farmacológico para a avaliação de agentes com potencial efeito cognitivo (KOUÉMOU et al., 2017). Por meio, então, desta metodologia, conduzimos os experimentos animais em modelos comportamentais e de memória.

O teste do *pellet* enterrado foi utilizado para investigar a memória olfativa dos animais. Os resultados apontaram que o bloqueio dos receptores colinérgicos muscarínicos causaram déficit sensorial nos animais do grupo ESC (1 mg kg<sup>-1</sup>; i.p.), mesmo após um período de privação alimentar, sendo consistente com os dados da literatura que apontam a ACh como um modulador importante da memória associativa olfativa. Tanto o bloqueio dos receptores colinérgicos quanto as lesões em neurônios de projeção colinérgica são capazes de interferir na aquisição desse tipo de memória (WILSON; FLETCHER; SULLIVAN, 2004). De maneira similar, a disfunção olfativa observada em pacientes nos estágios iniciais da DA (LIAN et al., 2019) pode ter como uma das possíveis causas o déficit colinérgico (ZOU et al., 2016). Apesar de ainda não ter sido demonstrada a eficácia (ou não) dos iAChE sobre a disfunção olfativa, Velayudhan e Lovestone (2009) demonstraram em um estudo aberto que a terapia com donepezila (5 – 10 mg / dia; v.o.) foi capaz de melhorar a identificação de odores por pacientes com DA. Mesmo com o viés atribuído ao desenho experimental, os resultados sugerem que a maior disponibilidade de ACh pode estar associada a melhorias na percepção olfativa. Sendo assim, podemos sugerir que o pré-tratamento com RSVA6 (100 mg kg<sup>-1</sup>; v.o.) desempenhou um papel neuroprotetor nos camundongos, provavelmente por meio da inibição da AChE que, conseqüentemente, ocasionou um aumento na concentração de ACh nas regiões cerebrais envolvidas nos processos olfativos.

Os testes de reconhecimento e de realocação de objetos (TRcO e TRaO, respectivamente) foram utilizados para avaliar a memória espacial e de reconhecimento de curto prazo dos animais, levando em consideração a tendência natural dos roedores em explorar aquilo que, para eles, representa uma novidade (LU et al., 2018). No presente estudo, os animais do grupo ESC (1 mg kg<sup>-1</sup>; i.p.) não foram capazes de distinguir tanto o objeto substituído no TRaO (Gráfico 3) quanto o objeto realocado no TRcO (Gráfico 5) em relação ao objeto familiar, e uma redução significativa no ID em relação ao grupo controle foi encontrada, estando em acordo a outros estudos (MALAMED et al., 2017; SUI et al., 2017; LU et al., 2018). Além disso, a comparação entre os grupos RSVA6 e ESC demonstrou aumento significativo no ID, sugerindo que a administração prévia do derivado de RSV apresentou efeito neuroprotetor aos animais induzidos ao dano

cognitivo. A fim de eliminar a possibilidade de efeitos locomotores ou ansiolíticos, os quais poderiam ser desencadeados pela administração de RSVA6, foram conduzidos experimentos no campo aberto e no labirinto em cruz elevado, os quais permitem avaliar os aspectos supramencionados (MURY et al., 2016). Na dose de 100 mg kg<sup>-1</sup>, o RSVA6 não exerceu efeito comportamental no experimento no campo aberto (Gráfico 4) e no labirinto em cruz elevado (Gráfico 6), sugerindo que o composto não afetou a atividade motora tampouco alterou o comportamento tipo-ansioso dos animais. O conjunto de dados deste trabalho e de trabalhos anteriores conduzidos pelo nosso grupo sugere que o RSVA6 possui ação neuroprotetora, possivelmente, pelo bloqueio da enzima AChE e, conseqüente, aumento da concentração de ACh na fenda sináptica durante processos neuropatológicos.

O declínio cognitivo, principalmente o comprometimento da memória, é uma das principais conseqüências relacionadas ao envelhecimento e presente na DA (IZQUIERDO et al., 2019). Sabe-se que o sistema colinérgico está envolvido no controle da atenção, do pensamento e dos estímulos (TRANG; KHANDHAR, 2019) e em casos de DA, os neurônios colinérgicos encontram-se comprometidos. O fato dos principais medicamentos aprovados para o tratamento sintomático da DA serem inibidores da AChE não deixa dúvidas a respeito do papel fundamental que a ACh exerce no processo patológico. Entretanto, como revisado neste presente trabalho, outros processos moleculares também parecem estar envolvidos no processo neurodegenerativo. Interessantemente, diversas moléculas bioativas, incluindo o RSV, têm demonstrado efeito neuroprotetor por meio de mecanismos que envolvem tanto o sistema colinérgico quanto outras vias, incluindo a amiloidogênica e neuroinflamatória (SAWDA; MOUSSA; TURNER, 2017).

As evidências científicas a respeito do potencial de inibição da AChE desempenhado pelo RSV são contraditórias (revisado por JABIR; KHAN; TABREZ, 2018). Salazar e colaboradores (2016) demonstraram, *in vitro*, não haver inibição significativa da AChE ou mudança nos parâmetros cinéticos com o uso do RSV. Em modelo animal, a molécula não foi capaz de reverter o dano cognitivo induzido pela escopolamina (RACHNA et al., 2012). Além disso, nosso grupo demonstrou que, pelo método de Ellmann, o RSV apresenta capacidade de inibição da AChE inferior ao RSVA6. Esses dados nos permitem especular que: 1) apesar de inibir a AChE em torno dos 55% o efeito neuroprotetor de RSV ocorra, principalmente, por outras vias; e 2) talvez RSVA6 possa também atuar em outros mecanismos, além do colinérgico.

Gomes e colaboradores (2018) correlacionaram o principal mecanismo neuroprotetor do RSV na DA com a possível ativação da sirtuína 1. Apesar de os mecanismos que envolvem a fitoalexina e o aumento de expressão de SIRT1 ainda serem totalmente desconhecidos, esse aumento pode ter um papel fundamental na proteção neuronal, no que diz respeito às EROs, à cascata de sinalização do NF- $\kappa$ B a partir da ativação da microglia, à prevenção da toxicidade de placas  $A\beta$ , além de poder contribuir nos processos de aprendizado e memória. A observação de que moléculas bioativas similares são mais prováveis de compartilharem alvos similares (GFELLER et al., 2014) sugere que RSVA6 seja um candidato em potencial a estudos posteriores que explorem outras vias envolvidas no processo patológico da DA.

## 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Diante do exposto, conclui-se que:

- A redução no número de –OH na estrutura de RSVA6 pode estar relacionada com a menor eficiência antioxidante do análogo, comparando-o com a molécula-líder;
- A atividade antioxidante parcial observada pode ser resultado da presença de um grupo –OH na posição *orto* do anel B, bem como a inserção da ligação N = C na estrutura de RSVA6;
- As alterações supracitadas podem estar relacionadas a uma maior biodisponibilidade de RSVA6. No entanto, estudos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese;
- A administração oral de RSVA6 em camundongos induzidos ao déficit cognitivo pela escopolamina conferiu efeito neuroprotetor na memória de trabalho dos animais;
- Provavelmente, um dos mecanismos envolvidos na neuroproteção conferida por RSVA6 foi a inibição da enzima AChE. Ensaios de doseamento tanto da ACh quanto da AChE nos tecidos cerebrais dos animais seriam necessários para confirmar essa hipótese;
- Não foram observadas mudanças locomotoras ou no comportamento tipo-ansiolítico após a administração de RSVA6.
- Os resultados obtidos sugerem RSVA6 como um potencial candidato à condução de novos ensaios complementares, incluindo sua ação sobre citocinas pró e anti-inflamatórias, seu perfil farmacocinético e seu comportamento frente aos agregados de A $\beta$ .

## REFERÊNCIAS

2013 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's Dement**, v. 9, n. 2, p.208–45, 2013.

ABHIJIT, S.; SUBRAMANYAM, M.V.V.; DEVI, S.A. Grape Seed Proanthocyanidin and Swimming Exercise Protects Against Cognitive Decline: A Study on M1 Acetylcholine Receptors in Aging Male Rat Brain. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 12, p.3573-3586, 2017.

AFFONSO, T.L.B. Estudo do desempenho em testes de memória e funções executivas de crianças de escola pública. 2017. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Psicologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.

AGO, Y. et al. Pharmacological aspects of the acetylcholinesterase inhibitor galantamine. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 116, n. 1, p.6-17, 2011.

ALBANI, D.; POLITO, L.; FORLONI, G. Sirtuins as novel targets for alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: experimental and genetic evidence. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 19, n. 1, p.11-26, 2010.

ALKHOULI, M.F. et al. Exercise and resveratrol increase fracture resistance in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, p.39-46, 2019.

ALVES, C.Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Acesso em 06 de junho de 2019. Disponível em [https://www.alz.org/alzheimers-dementia/diagnosis/medical\\_tests](https://www.alz.org/alzheimers-dementia/diagnosis/medical_tests)

AMIDON, G.L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, p.413-420, 1995.

AMRI, A. et al. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 2, p.182-193, 2012.

ANAND, P.; SINGH, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 4, p.375-399, 2013.

ARAÚJO, C.R.M.; SANTOS, V.L.A.; GONSALVES, A.A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química**. v. 8, n. 6, p.1818-1834, 2016.

Aricept (donepezil) [package insert]. Woodcliff Lake: Eisai Inc. Revised May 2014. Acesso em 18 de agosto de 2019. Disponível em [http://www.aricept.com/docs/pdf/aricept\\_PI.pdf](http://www.aricept.com/docs/pdf/aricept_PI.pdf).

ASHFORD, J.W. Treatment of Alzheimer's Disease: The Legacy of the Cholinergic Hypothesis, Neuroplasticity, and Future Directions. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 47, n. 1, p.149-156, 2015.

ASSIS, P.M. et al. Plinia cauliflora (Mart.) Kausel: toxicological assays, biological activities, and elemental analysis of organic compounds. **Natural Product Research**, p.1-5, 26 jun. 2019. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2019.1633642>.

AVILA, J. Our Working Point of View of Tau Protein. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 62, n. 3, p.1277-1285, 2018.

AYDIN, E. et al. The Effects of Inhaled Pimpinella peregrina Essential Oil on Scopolamine-Induced Memory Impairment, Anxiety, and Depression in Laboratory Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 9, p.6557-6567, 2016.

BALLARD, C. et al. Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 377, n. 9770, p.1019-1031, 2011.

BALLARD, C.; CORBETT, A. Management of Neuropsychiatric Symptoms in People with Dementia. **Cns Drugs**, v. 24, n. 9, p.729-739, 2010.

BARAGE, H.; SONAWANE, D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. **Neuropeptides**, v. 52, p.1-18, 2015.

BARNES, J. et al. Disease Course Varies According to Age and Symptom Length in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 64, n. 2, p.631-642, 2018.

BARTOLINI, M. et al.  $\beta$ -Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 3, p.407-416, 2003.

BARTUS, R. et al. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science**, v. 217, n. 4558, p.408-414, 1982.

BASHIR, S.O. Concomitant administration of resveratrol and insulin protects against diabetes mellitus type-1-induced renal damage and impaired function via an antioxidant-mediated mechanism and up-regulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. **Archives of Physiology And Biochemistry**, v. 125, n. 2, p.104-113, 2018.

BASTIANETTO, S.; MÉNARD, C.; QUIRION, R. Neuroprotective action of resveratrol. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease**, v. 1852, n. 6, p.1195-1201, 2015.

BEKRIS, L.M. et al. Review Article: Genetics of Alzheimer Disease. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, v. 23, n. 4, p.213-227, 2010.

BHUVANENDRAN, S. et al. Amelioration of Cognitive Deficit by Embelin in a Scopolamine-Induced Alzheimer's Disease-Like Condition in a Rat Model. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 655, p.1-12, 2018.

BIJAK, M.; PONCZEK, M.B.; NOWAK, P. Polyphenol compounds belonging to flavonoids inhibit activity of coagulation factor X. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.65, p.129–135, 2014.

BIRKS, J. et al. Rivastigmine for Alzheimer's disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2, p.1-191, 2009.

BLOOM, G.S. Amyloid- $\beta$  and Tau. **Jama Neurology**, v. 71, n. 4, p.505-508, 2014.

BOVOLENTA, T.; FELÍCIO, A. How do demographic transitions and public health policies affect patients with Parkinson's disease in Brazil? **Clinical Interventions In Aging**, v. 12, p.197-205, 2017.

BRASIL. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica (DBCA; CONCEA, 2016). MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DEEXPERIMENTAÇÃO ANIMAL–CONCEA, Brasília, DF, 2016.

BRIGGS, R.; KENNELLY, S.P.; O'NEILL, D. Drug treatments in Alzheimer's disease. **Clinical Medicine**, v. 16, n. 3, p.247-253, 2016.

BRILL, S.S. et al. Glucuronidation of trans-resveratrol by human liver and intestinal microsomes and UGT isoforms. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 4, p.469-479, 2006.

BUDNI, J. et al. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. **Aging and Disease**, v. 6, n. 5, p.331, 2015.

CALIL, N.O. et al. Antioxidant Activity of Synthetic Resveratrol Analogs: A Structure-Activity Insight. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 9, p.676–679, 2012.

CAO, W.; ZHENG, H. Peripheral immune system in aging and Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 13, n. 1, p.1-17, 2018.

CASTELLANI, R.J.; PLASCENCIA-VILLA, G.; PERRY, G. The amyloid cascade and Alzheimer's disease therapeutics: theory versus observation. **Laboratory Investigation**, v. 99, n. 7, p.958-970, 2019.

CENINI, G.; LLORET, A.; CASCELLA, R. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: From a mitochondrial point of view. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p.1-18, 2019.

CHATTERJEE, S. et al. Resveratrol's Hidden Hand: A Route to the Optical Detection of Biomolecular Binding. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.122, n.11, p.2841–2850, 2018.

CHEN, H. et al. Tacrine(10)-hupyrindone, a dual-binding acetylcholinesterase inhibitor, potently attenuates scopolamine-induced impairments of cognition in mice. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 4, p.1131-1139, 2018.

CHIMENTO, A. et al. Progress to Improve Oral Bioavailability and Beneficial Effects of Resveratrol. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, p.1381-1408, 2019.

COIMBRA, J.R.M. Alvos terapêuticos na Doença de Alzheimer - relevância da BACE 1e o desenvolvimento de inibidores desta secretase. 2016. 36 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016.

COLOVIC, M.B. et al. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p.315-335, 2013.

CONTESTABILE, A. The history of the cholinergic hypothesis. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p.334-340, 2011.

CORDER, E.H. et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. **Science**, v. 261, p.921–23, 1993.

COUGHLIN, S.S. Oxidative Stress, Antioxidants, Physical Activity, and the Prevention of Breast Cancer Initiation and Progression. **Journal of Environment and Health Sciences**, v. 4, n. 2, p.55-57, 2018.

COUTINHO, D.S. et al. Anti-inflammatory effects of resveratrol: mechanistic insights. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p.1812-1837, 2018.

CROUS-BOU, M. et al. Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p.1-9, 2017.

CZELUSNIAK, K.E. et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.2, p.400-409, 2012.

DAI, J.; MUMPER, R.J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, v.15, n.10, p.7313–7352, 2010.

DEARDORFF, W.J.; FEEN, E.; GROSSBERG, G.T. The Use of Cholinesterase Inhibitors Across All Stages of Alzheimer's Disease. **Drugs & Aging**, v. 32, n. 7, p.537-547, 2015.

DINAMARCA, M.C. et al. Amyloid- $\beta$ -Acetylcholinesterase complexes potentiate neurodegenerative changes induced by the A $\beta$  peptide. Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 5, n. 1, p.4-19, 2010.

DO, M.T. et al. Metformin induces microRNA-34a to downregulate the Sirt1/Pgc-1 $\alpha$ /Nrf2 pathway, leading to increased susceptibility of wild-type p53 cancer cells to oxidative stress and therapeutic agents. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 74, p.21-34, 2014.

DOGAN, T. The effects of hydrogen peroxide, gallic acid and resveratrol on growth and catalase production of *Aspergillus fumigatus*. 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Graduate School Of Natural And Applied Sciences, Middle East Technical University, Ankara, 2008.

DOUCHAMPS, V.; MATHIS, C. A second wind for the cholinergic system in Alzheimer's therapy. **Behavioural Pharmacology**, v. 28, p.112-123, 2017.

DROLLE, E. et al. Atomic force microscopy to study molecular mechanisms of amyloid fibril formation and toxicity in Alzheimer's disease. **Drug Metabolism Reviews**, v. 46, n. 2, p.207-223, 2014.

DU, X.; WANG, X.; GENG, M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. **Translational Neurodegeneration**, v. 7, n. 2, p.1-7, 2018.

DULAWA, S.C.; JANOWSKY, D.S. Cholinergic regulation of mood: from basic and clinical studies to emerging therapeutics. **Molecular Psychiatry**, v. 24, n. 5, p.694-709, 2018.

DURACKOVA, Z. Some Current Insights into Oxidative Stress. **Physiological Research**, v. 59, n. 4, p.459-469, 2010.

ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p.88-95, 1961.

FACCHINETTI, R.; BRONZUOLI, M.R.; SCUDERI, C. An Animal Model of Alzheimer Disease Based on the Intrahippocampal Injection of Amyloid  $\beta$ -Peptide (1–42). **Neurotrophic Factors**, v. 1727, p.343-352, 2017.

FALCO, A.D. et al. Doença de alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Química Nova**, v. 39, n. 1, p.63-80, 2016.

FARLOW, M. et al. Safety and tolerability of donepezil 23 mg in moderate to severe Alzheimer's disease. **Bmc Neurology**, v. 11, n. 1, p.1-8, 2011.

FEI, Q. et al. Molecular Mechanism of Resveratrol's Lipid Membrane Protection. **Scientific Reports**, v.8, n.1, p.1587, 2018.

FOCHAT, R.C. et al. Prevalências de doenças de grande impacto na saúde pública em idosos frágeis residentes na zona da mata mineira-brasil: um estudo de base populacional. **Revista de APS (Online)**, v. 19, p. 268-276, 2016.

FOTIOU, D. et al. Evaluation of the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease with neuropsychological methods. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 27, n. 5, p.727-733, 2015.

FOX, G.A.; TORIGOE, E.; BUTCHER, G.Q. Constructing an Inexpensive Elevated Plus Maze. **Journal of Undergraduate Neuroscience Education**, v. 16, n. 2, p.R44–R47, 2018.

FRANCO, D.C.Z. et al. Inhibitory Effects of Resveratrol Analogs on Mushroom Tyrosinase Activity. **Molecules**, v. 17, n. 10, p.11816-11825, 2012.

GAMBINI, J. et al. Properties of resveratrol: *in vitro* and *in vivo* studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2015, p.1-13, 2015.

GANDY, K.A.O. et al. Resveratrol (3, 5, 4'-Trihydroxy-trans-Stilbene) Attenuates a Mouse Model of Multiple Sclerosis by Altering the miR-124/Sphingosine Kinase 1 Axis in Encephalitogenic T Cells in the Brain. **Journal Of Neuroimmune Pharmacology**, p.1-16, 2019.

GAUSS, C.J. "Geburten in künstlichem Dämmer Schlaf." **Archiv der Gynäkologie**, v. 78, n. 3, p.579-631, 1906. Disponível em <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF01707967>

GFELLER, D. et al. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 1, p.32-38, 2014.

GIUFFRIDA, M.L.; COPANI, A.; RIZZARELLI, E. A promising connection between BDNF and Alzheimer's disease. **Aging**, [s.l.], v. 10, n. 8, p.1791-1792, 6 2018. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/aging.101518>.

GLYNN-SERVEDIO, B.E.; RANOLA, T.S. AChE Inhibitors and NMDA Receptor Antagonists in Advanced Alzheimer's Disease. **The Consultant Pharmacist**, v. 32, n. 9, p.511-518, 2017.

GOMES, B.A.Q. et al. Neuroprotective Mechanisms of Resveratrol in Alzheimer's Disease: Role of SIRT1. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p.1-15, 2018.

GOTHWAL, A. et al. Behavioral and Biochemical Implications of Dendrimeric Rivastigmine in Memory-Deficit and Alzheimer's Induced Rodents. **Acs Chemical Neuroscience**, v. 10, n. 8, p.3789-3795, 2019.

GÜLÇİN, İ. Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p.210-218, 2010.

GUO, T.; NOBLE, W.; HANGER, D.P. Roles of tau protein in health and disease. **Acta Neuropathologica**, v. 133, n. 5, p.665-704, 2017.

HAAM, J.; YAKEL, J.L. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. **Journal of Neurochemistry**, v. 142, p.111-121, 2017.

- HAAN, G.; LAZARE, S.S. Aging of hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 131, n. 5, p.479-487, 2018.
- HAHN, G.F.; OLIVEIRA, J.R.; BOCK, P.M. O papel do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) no diabetes mellitus. **Clinical & Biomedical Research**, v. 37, n. 3, p.203-213, 2017.
- HAMPEL, H. et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. **Brain**, v. 141, n. 7, p.1917-1933, 2018.
- HASSELMO, M.; SARTER, M. Modes and Models of Forebrain Cholinergic Neuromodulation of Cognition. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, p.52-73, 2011.
- HENEKA, M.T. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p.388-405, 2015.
- HOLM, I.; ALSTRUP, A.K.O.; LUO, Y. Genetically modified pig models for neurodegenerative disorders. **The Journal of Pathology**, v. 238, n. 2, p.267-287, 2015.
- HUANG, W.; ZHANG, X.; CHEN, W. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. **Biomedical Reports**, v. 4, n. 5, p.519-522, 2016.
- IBRAHIM, M.; GABR, M. Multitarget therapeutic strategies for Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 3, p.437-440, 2019.
- ITTNER, L.M.; GÖTZ, J. Amyloid- $\beta$  and tau — a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 2, p.67-72, 2010.
- IUGA, C.; ALVAREZ-IDABOY, J.R.; RUSSO, N. Antioxidant activity of trans-resveratrol toward hydroxyl and hydroperoxyl radicals: a quantum chemical and computational kinetics study. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 77, n. 8, p.3868-3877, 2012.
- IZQUIERDO, I. et al. Memória: tipos e mecanismos – achados recentes. **Revista USP**, n. 98, p.9-16, 2013.
- IZQUIERDO, I. et al. The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 1, p. 115-127, 2008.
- IZQUIERDO, V. et al. Maternal Resveratrol Supplementation Prevents Cognitive Decline in Senescent Mice Offspring. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p.1134-1151, 2019.
- JABIR, N.R.; KHAN, F.R.; TABREZ, S. Cholinesterase targeting by polyphenols: A therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease. **Cns Neuroscience & Therapeutics**, v. 24, n. 9, p.753-762, 2018.

JACOBSON, S.A.; SABBAGH, M.N. Donepezil: potential neuroprotective and disease-modifying effects. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 4, n. 10, p.1363-1369, 2008.

JERUSALINSKY, D.; KORNISIUK, E.; IZQUIERDO, I. Cholinergic Neurotransmission and Synaptic Plasticity Concerning Memory Processing. **Neurochemical Research**, v. 22, n. 4, p.507-515, 1997.

JOHNSON-WEAVER, B.T. et al. Adjuvanted immunotherapy approaches for peanut allergy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p.2156-2164, 2018.

JUNIOR, J.V.M.; TEIXEIRA, C.B.; MACEDO, G.A. Biotransformation and bioconversion of phenolic compounds obtainment: an overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.35, n.1, p.75-81, 2015.

KARTHICK, C. et al. Intrahippocampal administration of ibotenic acid induced cholinergic dysfunction via NR2A/NR2B expression: implications of resveratrol against alzheimer disease pathophysiology. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 9, n. 28, p.1-16, 2016.

KASIOTIS, K.M. et al. Resveratrol and related stilbenes: Their anti-aging and anti-angiogenic properties. **Food and Chemical Toxicology**, v.61, p.112–120, 2013.

KHALID, S. et al. Antioxidant resveratrol protects against copper oxide nanoparticle toxicity in vivo. **Naunyn-schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 391, n. 10, p.1053-1062, 2018.

KIM, M. et al. Reference Intervals for Plasma Amyloid  $\beta$  in Korean Adults Without Cognitive Impairment. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 36, n. 6, p.595-598, 2016.

KLINKENBERG, I.; BLOKLAND, A. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: A review of animal behavioral studies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 8, p.1307-1350, 2010.

KNEZ, D. et al. Dual inhibitors of cholinesterases and monoamine oxidases for Alzheimer's disease. **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 8, p.811-832, 2017.

KOLAROVA, M. et al. Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2012, p.1-13, 2012.

KOMAROVA, N.L.; THALHAUSER, C.J. High Degree of Heterogeneity in Alzheimer's Disease Progression Patterns. **Plos Computational Biology**, v. 7, n. 11, p.1-6, 2011.

KONYALIOGLU, S. et al. Effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in embryonic neural stem cells. **Neural Regeneration Research**, v. 8, n. 6, p.485–495, 2013.

KOUÉMOU, N.E. et al. Nootropic and Neuroprotective Effects of *Dichrocephala integrifolia* on Scopolamine Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. 847, p.1-10, 2017.

KOWIAŃSKI, P. et al. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. **Cellular And Molecular Neurobiology**, v. 38, n. 3, p.579-593, 2018.

KUMAR, A.; SINGH, A.; EKAVALI. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 2, p.195-203, 2015.

KUNDU, J.K.; SURH, Y. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. **Cancer Letters**, v. 269, n. 2, p.243-261, 2008.

LANÇON, A.; FRAZZI, R.; LATRUFFE, N. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-angiogenic properties of resveratrol in ocular diseases. **Molecules**, v. 21, n. 3, p.304-312, 2016.

LANE, C.A.; HARDY, J.; SCHOTT, J.M. Alzheimer's disease. **European Journal of Neurology**, v. 25, n. 1, p.59-70, 2017.

LANGUILLE, S. et al. The grey mouse lemur: A non-human primate model for ageing studies. **Ageing Research Reviews**, v. 11, n. 1, p.150-162, 2012.

LAPOINTE, N.E. et al. The amino terminus of tau inhibits kinesin-dependent axonal transport: Implications for filament toxicity. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 2, p.440-451, 2009.

LAURIJSSENS, B. et al. Animal models of Alzheimer's disease and drug development. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 10, n. 3, p.319-327, 2013.

LEE, J. et al. Effects of chronic scopolamine treatment on cognitive impairment and neurofilament expression in the mouse hippocampus. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 1, p.1625-1632, 2018.

LEE, J. et al. Ethanol Extract of *Oldenlandia diffusa* Herba Attenuates Scopolamine-Induced Cognitive Impairments in Mice via Activation of BDNF, P-CREB and Inhibition of Acetylcholinesterase. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p.363-375, 2018.

LEHMKUHL, A.M.; DIRR, E.R.; FLEMING, S.M. Olfactory Assays for Mouse Models of Neurodegenerative Disease. **Journal of Visualized Experiments**, n. 90, p.1-6, 2014.

LI, J. et al. Risk factors for predicting progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 87, n. 5, p.476-484, 2015.

LIAN, T. et al. Clinical, Structural, and Neuropathological Features of Olfactory Dysfunction in Patients with Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 70, n. 2, p.413-423, 2019.

LIGUORI, I. et al. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. 13, p.757-772, 2018.

LIN, J. et al. Fucoxanthin, a Marine Carotenoid, Reverses Scopolamine-Induced Cognitive Impairments in Mice and Inhibits Acetylcholinesterase in Vitro. **Marine Drugs**, v. 14, n. 4, p.67-84, 2016.

LIU, Q. et al. Resveratrol synergizes with low doses of L-DOPA to improve MPTP-induced Parkinson disease in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 367, p.10-18, 2019.

LONGO, V.D. et al. Interventions to Slow Aging in Humans: Are We Ready?. **Aging Cell**, v. 14, n. 4, p.497-510, 2015.

LÓPEZ-OTÍN, C. et al. The Hallmarks of Aging. **Cell**, v. 153, n. 6, p.1194-1217, 2013.

LÓPEZ-VALES, R.; DAVID, S. Bioactive Lipids in Inflammation after Central Nervous System Injury. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p.181-194, 2019.

LOU, Y. et al. The acute hepatotoxicity of tacrine explained by <sup>1</sup>H NMR based metabolomic profiling. **Toxicology Research**, v. 4, n. 6, p.1465-1478, 2015.

LU, C. et al. Genistein Ameliorates Scopolamine-Induced Amnesia in Mice Through the Regulation of the Cholinergic Neurotransmission, Antioxidant System and the ERK/CREB/BDNF Signaling. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 1153, p.1-11, 2018.

LU, C. et al. Neuroprotective Effects of Soy Isoflavones on Scopolamine-Induced Amnesia in Mice. **Nutrients**, v. 10, n. 7, p.853-876, 2018.

LU, J. et al. The antioxidant effect of imine resveratrol analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 17, p.5744-5747, 2012.

LUCAS, G. T. et al. Assessment of different pharmacological activities of *Cayaponia tayuya* (vell.) cogn. **Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology**, v. 6, p.9391-9395, 2019.

MAGAKI, S. et al. The effects of cerebral amyloid angiopathy on integrity of the blood-brain barrier. **Neurobiology of Aging**, v. 70, p.70-77, 2018.

MAGALHÃES, L.D. A ciência e os animais de laboratório. **RESBCAL**, v.1, n.1, p.7-13, 2012.

MAGALHÃES, T.N.C. et al. Systemic Inflammation and Multimodal Biomarkers in Amnestic Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 7, p.5689-5697, 2018.

MALHOTRA, A.; BATH, S.; ELBARBRY, F. An Organ System Approach to Explore the Antioxidative, Anti-Inflammatory, and Cytoprotective Actions of Resveratrol. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2015, p.1–15, 2015.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n.5, p.727–747, 2004.

MANDELKOW, E.M. et al. Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 8, p.1079-1085, 2003.

MARTIN, L.; LATYPOVA, X.; TERRO, F. Post-translational modifications of tau protein: Implications for Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, v. 58, n. 4, p.458-471, 2011.

MARTINS, I.C.F. et al. Delivering Resveratrol on the Buccal Mucosa Using Mucoadhesive Tablets: A Potential Treatment Strategy for Inflammatory Oral Lesions. **Current Drug Delivery**, v. 15, n. 2, p.254-259, 2018.

MARVIN Js - Designing molecules on the web. Disponível em <https://marvinjs-demo.chemaxon.com/latest/>

MASTERS, C.L. et al. Alzheimer's disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, p.1-18, 2015.

MATIAS, M.L. Modificações Estruturais de Compostos Polifenólicos Glicosilados e Modulação das suas Atividades Antioxidantes, 2012. 125f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química Farmacêutica Industrial, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2012.

MATOS, K.S. Aspectos Moleculares da Reativação da Acetilcolinesterase Inibida por Ciclosarin e Carbofurano. 2012. 149 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MEHTA, M.; ADEM, A.; SABBAGH, M. New Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. **International Journal Of Alzheimer's Disease**, v. 2012, p.1-8, 2012.

MELAMED, J. L. et al. Scopolamine Induces Deficits in Spontaneous Object-Location Recognition and Fear-Learning in Marmoset Monkeys. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n.395, p.1-10, 2017.

MELAMED, J.L. et al. Scopolamine induces deficits in spontaneous object-location recognition and fear-learning in marmoset monkeys. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. 395, p.1-10, 2017.

MÉNDEZ-ROJAS C. et al. Synthesis and biological evaluation of potential acetylcholinesterase inhibitors based on a benzoxazine core. **Archiv der Pharmazie**, v. 351, n. 5, p.e1800024, 2018. doi: 10.1002/ardp.201800024.

MICHALOWSKY, B. et al. Cost-effectiveness of a collaborative dementia care management—Results of a cluster-randomized controlled trial. **Alzheimer's & Dementia**, p.1-13, 2019.

MIETELSKA-POROWSKA, A. et al. Tau Protein Modifications and Interactions: Their Role in Function and Dysfunction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 3, p.4671-4713, 2014.

MIKSITS, M. et al. Sulfation of resveratrol in human liver: Evidence of a major role for the sulfotransferases SULT1A1 and SULT1E1. **Xenobiotica**, v. 35, n. 12, p.1101-1119, 2005.

MINCIULLO, P.L. et al. Inflammaging and Anti-Inflammaging: The Role of Cytokines in Extreme Longevity. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis**, v. 64, n. 2, p.111-126, 2016.

MURIAS, M. et al. Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure–activity relationship. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 6, p.903-912, 2005.

MURY, F.B. et al. Lithium activates brain phospholipase A2 and improves memory in rats: implications for Alzheimer's disease. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 7, n. 266, p.607-618, 2016.

MUSHTAQ, A.; ANWAR, R.; AHMAD, M. Lavandula stoechas (L) a Very Potent Antioxidant Attenuates Dementia in Scopolamine Induced Memory Deficit Mice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 1375, p.1-11, 2018.

NEFF, E.P. Animal models of Alzheimer's disease embrace diversity. **Lab Animal**, v. 48, n. 9, p.255-259, 2019.

NEMES, R. et al. Reactive Oxygen and Nitrogen Species Regulate Key Metabolic, Anabolic, and Catabolic Pathways in Skeletal Muscle. **Antioxidants**, v. 7, n. 7, p.85-98, 2018.

NEVES, A.R. et al. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. **International Journal of Nanomedicine**, p.177-187, 2013.

NEWMAN, E.L. et al. Cholinergic modulation of cognitive processing: insights drawn from computational models. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 6, n. 24, p.1-19, 2012.

NGUYEN, C. et al. Resveratrol, Potential Therapeutic Interest in Joint Disorders: A Critical Narrative Review. **Nutrients**, v.9, n.1, p.45, 2017.

NHAN, H.S.; CHIANG, K.; KOO, E.H. The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes. **Acta Neuropathologica**, v. 129, n. 1, p.1-19, 2015.

NYAKAS, C. et al. The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia. Rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid- $\beta$ 42 with memantine. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p.594-603, 2011.

Oliveira, C.S. et al. Development and Preliminary Cosmetic Potential Evaluation of Melaleuca alternifolia cheel (Myrtaceae) Oil and Resveratrol for Oily Skin. **Journal of Dermatology Research and Therapy**, v. 2, n. 4, p.1-6, 2016.

OLIVEIRA, L.B.A. et al. Cosmetic Potential of a Liotropic Liquid Crystal Emulsion Containing Resveratrol. **Cosmetics**, v. 4, n. 4, p.54-66, 2017.

PANGENI, R. et al. Resveratrol: review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v.11, n.8, p.1285–1298, 2014.

PARENT, M.B. Septohippocampal Acetylcholine: Involved in but not Necessary for Learning and Memory?. **Learning & Memory**, v. 11, n. 1, p.9-20, 2004.

PARMAR, R.; HIGHLAND, H.; GEORGE, L. Molecular Modelling of *Anopheles stephensi* - Acetylcholinesterase. **Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences**, v. 4, n. 3, p.1-9, 2018.

PARONI, G.; BISCEGLIA, P.; SERIPA, D. Understanding the Amyloid Hypothesis in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 68, n. 2, p.493-510, 2019.

PAULA, D.T.S. et al. Synthesis, cytotoxicity and antileishmanial activity of aza-stilbene derivatives. **Mediterranean Journal of Chemistry**, v. 2, n. 3, p.493-502, 2013.

PAULA, V.J.R. de; GUIMARAES, F.M.; FORLENZA, O.V. Papel da proteína Tau na fisiopatologia da demência frontotemporal. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 36, n. 5, p.197-202, 2009.

PAVAN, F.R. et al. Synthesis and AntiMycobacterium tuberculosis Evaluation of Aza-Stilbene Derivatives. **Scientific World Journal**, v. 11, p.1113–1119, 2011.

PEÑALVA, R. et al. Increased Oral Bioavailability of Resveratrol by Its Encapsulation in Casein Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p.2816-2833, 2018.

PETRONILHO, E.C.; PINTO, A.C.; VILLAR, J.D.F. Acetilcolinesterase: Alzheimer e Guerra Química. **CAT**, p.1-12, 2011.

PICCIOTTO, M.R.; HIGLEY, M.J.; MINEUR, Y.S. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. **Neuron**, v. 76, n. 1, p.116-129, 2012.

POHANKA, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. **Biomedical Papers**, v. 155, n. 3, p.219-229, 2011.

PRADO, V.F. et al. Cholinergic circuits in cognitive flexibility. **Neuroscience**, v. 345, p.130-141, 2017.

PURVES, D. et al. Temporal Categories of Memory. 2a edição. Sunderland: Neuroscience, 2001. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10948/>

QI, Y. et al. Intracerebroventricular injection of resveratrol ameliorated A $\beta$ -induced learning and cognitive decline in mice. **Metabolic Brain Disease**, v. 34, n. 1, p.257-266, 2019.

RACHNA, G. et al. Effect of resveratrol on scopolamine-induced cognitive impairment in mice. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 2, p.438-444, 2012.

REGE, S.D. et al. Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, p.218-230, 2014.

REITZ, C.; MAYEUX, R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. **Biochemical Pharmacology**, v. 88, n. 4, p.640-651, 2014.

REYES, A.E. et al. Acetylcholinesterase-A $\beta$  Complexes Are More Toxic than A $\beta$  Fibrils in Rat Hippocampus. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 6, p.2163-2174, 2004.

RIBA, A. et al. Cardioprotective effect of resveratrol in a postinfarction heart failure model. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p.1-10, 2017.

RICCIARELLI, R.; FEDELE, E. The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. **Current Neuropharmacology**, v. 15, n. 6, p.926-935, 2017.

RITTER, J.K. Intestinal UGTs as potential modifiers of pharmacokinetics and biological responses to drugs and xenobiotics. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 3, n. 1, p.93-107, 2007.

RODRIGUES, A.L.S. et al. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-wky avoidance tasks. **Pharmacology & Toxicology**, v. 79, n. 3, p.150-156, 1996.

ROLEIRA, F.M.F. et al. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. **Food Chemistry**, v. 183, p.235-258, 2015.

ROUPE, K.A. et al. Pharmacometrics of Stilbenes: Seguing Towards the Clinic. **Current Clinical Pharmacology**, v.1, p.81-101, 2006.

RUKMANGADACHAR, L.A.; BOLLU, P.C. Amyloid Beta Peptide. StatPearls Publishing; 2019 Jan-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459119/>

SALAZAR, P.B. et al. Differential inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by polyphenols epigallocatechin-3-gallate and resveratrol. Relevance of the membrane-bound form. **Biofactors**, v. 43, n. 1, p.73-81, 2016.

SALEHI, B. et al. Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits. **Biomedicines**, v. 6, n. 3, p.91-111, 2018.

SANTOS, A.C. et al. Nanotechnology-based formulations for resveratrol delivery: Effects on resveratrol in vivo bioavailability and bioactivity. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 180, p.127-140, 2019.

SANTOS, S.I.P. Estudos de Actividade Inibidora de Acetilcolinesterase e Actividade Antioxidante por Derivados de Colina de Ácidos Cafeico, Cinâmico e Rosmarínico. *Metabolismo In Vitro Destes Compostos*. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.

SASAGURI, H. et al. APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. **The Embo Journal**, v. 36, n. 17, p.2473-2487, 2017.

SAWDA, C.; MOUSSA, C.; TURNER, R. Scott. Resveratrol for Alzheimer's disease. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1403, n. 1, p.142-149, 2017.

SCHELTENS, P. et al. Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 388, n. 10043, p.505-517, 2016.

SEKIGUCHI, K. et al. Resveratrol attenuates inflammation-induced hyperexcitability of trigeminal spinal nucleus caudalis neurons associated with hyperalgesia in rats. **Molecular Pain**, v. 12, p.1-11, 2016.

SELKOE, D.J.; HARDY, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. **Embo Molecular Medicine**, v. 8, n. 6, p.595-608, 2016.

SERGIDES, C. et al. Bioavailability and safety study of resveratrol 500 mg tablets in healthy male and female volunteers. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 11, n. 1, p.164-170, 2015.

SERRANO-POZO, A. et al. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, p.a006189, 2011.

SHI, Y. et al. HMGB1 mediates microglia activation via the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway in coriaria lactone induced epilepsy. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 4, p.5125-51231, 2018.

SHIN, S.; DIXON, C. Targeting  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors: a future potential for neuroprotection from traumatic brain injury. **Neural Regeneration Research**, v. 10, n. 10, p.1552-1554, 2015.

SHINO, M.Z.T. et al. The effects of cerebral amyloid angiopathy on integrity of the blood-brain barrier. **Neurobiology of Aging**, v. 70, p.70-77, 2018.

SILVA, C.F. Condições de alojamento: influência no comportamento, na neurogênese do hipocampo e no efeito de drogas padrão em camundongos swiss adultos. 2011. 11 f. Tese

(Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

SILVÉRIO, G.C.; ROSAT, R.M. Memória de Longo-Prazo: Mecanismos Neurofisiológicos de Formação. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 16, n. 4, p.219-23, 2006.

SIMKOVITCH, R.; HUPPERT, D. Excited-State Proton Transfer in Resveratrol and Proposed Mechanism for Plant Resistance to Fungal Infection. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.119, n.35, p.11684–11694, 2015.

SMOLIGA, J.; BLANCHARD, O. Enhancing the Delivery of Resveratrol in Humans: If Low Bioavailability is the Problem, What is the Solution? **Molecules**, v. 19, n. 11, p.17154-17172, 2014.

SOLDATI, P.P. Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas utilizando manteiga natural para aplicação tópica. 2015. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

SOLDATI, P.P. et al. Controlled release of resveratrol from lipid nanoparticles improves antioxidant effect. **Ifac-papersonline**, v. 51, n. 27, p.16-21, 2018.

SORIAL, M.E.; SAYED, N.S.E.D.E. Protective effect of valproic acid in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease mouse model: possible involvement of the cholinergic system. **Naunyn-schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 390, n. 6, p.581-593, 2017.

SOUFI, F.G. et al. Chronic resveratrol administration has beneficial effects in experimental model of type 2 diabetic rats. **Endocrine Regulations**, v. 46, n. 02, p.83-90, 2012.

SPOGLI, R. et al. Solid dispersion of resveratrol supported on magnesium dihydroxide (Resv@MDH) microparticles improves oral bioavailability. **Nutrients**, v. 10, n. 12, p.1925-1935, 2018.

SPRINGER, M.; MOCO, S. Resveratrol and Its Human Metabolites—Effects on Metabolic Health and Obesity. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p.143-160, 2019.

SREEJAYAN, N.; RAO, M.N. Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Arzneimittelforschung*, v. 2, n. 46, p.169-171, 1996.

STELZMANN, R.A.; SCHNITZLEIN, H.N.; MURTAGH, F.R. An english translation of alzheimer's 1907 paper, ?Uber eine eigenartige erkankung der hirnrinde? **Clinical Anatomy**, v. 8, n. 6, p.429-431, 1995..

STIVALA, L.A. et al. Specific Structural Determinants Are Responsible for the Antioxidant Activity and the Cell Cycle Effects of Resveratrol. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p.22586-22594, 2001. doi: 10.1074/jbc.M101846200.

STORNILO, C.E.; MORENO, J.J. Resveratrol Analogs with Antioxidant Activity Inhibit Intestinal Epithelial Cancer Caco-2 Cell Growth by Modulating Arachidonic Acid Cascade. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 3, p.819-828, 2018.

SUI, Z. et al. Aqueous extracts from asparagus stems prevent memory impairments in scopolamine-treated mice. **Food & Function**, v. 8, n. 4, p.1460-1467, 2017.

SUMMERLIN, N. et al. Resveratrol nanoformulations: Challenges and opportunities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 479, n. 2, p.282-290, 2015.

SUN, A.Y. et al. Resveratrol as a Therapeutic Agent for Neurodegenerative Diseases. **Molecular Neurobiology**, v. 41, n. 2-3, p.375-383, 2010.

SUN, M. Roles of neural regeneration in memory pharmacology. **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 3, p.406-407, 2018.

SZEKERES, T. et al. Resveratrol and resveratrol analogues—structure—activity relationship. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 6, p.1042-1048, 2010.

TAKEDA, S.; SATO, N.; MORISHITA, R. Systemic inflammation, blood-brain barrier vulnerability and cognitive/non-cognitive symptoms in Alzheimer disease: relevance to pathogenesis and therapy. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, n. 171, p.1-8, 2014.

TALIB, L.L. et al. Increased iPLA2 activity and levels of phosphorylated GSK3B in platelets are associated with donepezil treatment in Alzheimer's disease patients. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 265, n. 8, p.701-706, 2015.

TAYEB, H.O. et al. Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 134, n. 1, p.8-25, 2012.

TEIXEIRA, J.B. et al. Mortality from Alzheimer's disease in Brazil, 2000-2009. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p.850-860, 2015.

TELLECHEA, P. et al. Enfermedad de Alzheimer de inicio precoz y de inicio tardío: ¿son la misma entidad? **Neurología**, v. 33, n. 4, p.244-253, 2018.

TELLONE, E. et al. Resveratrol: A Focus on Several Neurodegenerative Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p.1-14, 2015.

TRANG, A.; KHANDHAR, P.B. Physiology, Acetylcholinesterase. Treasure Island: StatPearls, 2019. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539735/>

TROJANOWSKI, J.Q.; MATTSON, M.P. Overview of Protein Aggregation in Single, Double, and Triple Neurodegenerative Brain Amyloidoses. **Neuromolecular Medicine**, v. 4, n. 1-2, p.1-6, 2003.

TSENG, P. et al. Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by upregulating RUNX2 gene expression via the SIRT1/FOXO3A axis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 10, p.2552-2563, 2011.

TUONG, W.; WALKER, L.; SIVAMANI, R. K. Polyphenols as novel treatment options for dermatological diseases: A systematic review of clinical trials. **Journal of Dermatological Treatment**, v.26, n.4, p.381–388, 2015.

UNG, D.; NAGAR, S. Variable Sulfation of Dietary Polyphenols by Recombinant Human Sulfotransferase (SULT) 1A1 Genetic Variants and SULT1E1. **Drug Metabolism And Disposition**, v. 35, n. 5, p.740-746, 2007.

VELAYUDHAN, L.; LOVESTONE, S. Smell Identification Test as a Treatment Response Marker in Patients With Alzheimer Disease Receiving Donepezil. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 29, n. 4, p.387-390, 2009.

VENTURA, A.L.M. et al. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Archives of Clinical Psychiatry**, v. 37, n. 2, p.66-72, 2010.

VERWILST, P. et al. Shedding light on tau protein aggregation: the progress in developing highly selective fluorophores. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 7, p.2249-2265, 2018.

VILLEMAGNE, V.L. et al. Longitudinal assessment of A $\beta$  and cognition in aging and Alzheimer disease. **Annals of Neurology**, v. 69, n. 1, p.181-192, 2011.

WALKER, K.A. Inflammation and neurodegeneration: chronicity matters. **Aging**, v. 11, n. 1, p.3-4, 2018.

WALKER, L.C. Proteopathic Strains and the Heterogeneity of Neurodegenerative Diseases. **Annual Review of Genetics**, v. 50, n. 1, p.329-346, 2016.

WALLE, T. Bioavailability of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, n. 1, p.9-15, 2011.

WALLE, T. et al. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 12, p.1377-1382, 2004.

WANG, M. et al. Noncoding RNAs as Molecular Targets of Resveratrol Underlying Its Anticancer Effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 17, p.4709-4719, 2019.

WANG, P.; SANG, S. Metabolism and pharmacokinetics of resveratrol and pterostilbene. **Biofactors**, v. 44, n. 1, p.16-25, 2018.

WATSON, N. et al. Chronic inflammation – inflammaging – in the ageing cochlea: A novel target for future presbycusis therapy. **Ageing Research Reviews**, v. 40, p.142-148, 2017.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Ageing and health**, 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>>. Acesso em: 05 jun. 2019.

WILSON, D.A. Acetylcholine and Olfactory Perceptual Learning. **Learning & Memory**, v. 11, n. 1, p.28-34, 2004.

**World Alzheimer Report 2018: The state of the art of dementia research: new frontiers**. Londres: Alzheimer's Disease International, 2018. Disponível em: <<https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2018.pdf>>. Acesso em: 07 ago. 2019.

XU, N. et al. Neuroprotective effect of salidroside against central nervous system inflammation-induced cognitive deficits: A pivotal role of sirtuin 1-dependent Nrf-2/ HO -1/ NF - $\kappa$  B pathway. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 5, p.1438-1447, 2019.

XU, Y.M. et al. Kai Xin San ameliorates scopolamine-induced cognitive dysfunction. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 5, p.794-804, 2019.

YADAV, M.K. et al. Neuroprotective Activity of *Evolvulus alsinoides* & *Centella asiatica* Ethanolic Extracts in Scopolamine-Induced Amnesia in Swiss Albino Mice. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 7, n. 7, p.1059-1066, 2019.

YANEZ, M. et al. Nicotinamide Augments the Anti-Inflammatory Properties of Resveratrol through PARP1 Activation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p.1-10, 2019.

YANG, H. et al. Study of brain morphology change in Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment compared with normal controls. **General Psychiatry**, v. 32, n. 2, p.1-9, 2019.

YANG, M.; CRAWLEY, J.N. Simple Behavioral Assessment of Mouse Olfaction. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 8, n. 24, p.1-8, 2009.

YIANNOPOULOU, K.G.; PAPAGEORGIU, S.G. Current and future treatments for Alzheimer's disease. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, v. 6, n. 1, p.19-33, 2013.

YU, X.; LI, G. Effects of resveratrol on longevity, cognitive ability and aging-related histological markers in the annual fish *Nothobranchius guentheri*. **Experimental Gerontology**, v. 47, n. 12, p.940-949, 2012.

ZAINAL, N. et al. Resveratrol treatment reveals a novel role for HMGB1 in regulation of the type 1 interferon response in dengue virus infection. **Scientific Reports**, v. 7, n. 42998, 2017.

ZHANG, X. Resveratrol Attenuates Acute Inflammatory Injury in Experimental Subarachnoid Hemorrhage in Rats via Inhibition of TLR4 Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, p.1331-1345, 2016.

ZHOU, Y. et al. Alzheimer's disease: amyloid-based pathogenesis and potential therapies. **Cell Stress**, v. 2, n. 7, p.150-161, 2018.

ZHOU, Z. et al. Anti-inflammatory activity of resveratrol prevents inflammation by inhibiting NF- $\kappa$ B in animal models of acute pharyngitis. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 1, p.1269-1274, 2017.

ZOU, Y. et al. Olfactory dysfunction in Alzheimer's disease. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 12, p.869-875, 2016.

## ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Comissão de Ética no  
Uso de Animais



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação da relação entre doenças imunomediadas vs. sintomas neurológicos e déficits cognitivos.", protocolada sob o CEUA nº 3914220319 (ID 001242), sob a responsabilidade de **Rafael Cypriano Dutra e equipe; Eduarda Gomes Ferrarini; Elaine Cristina Dalazen Gonçalves; Jaíne Ferrareis Menegasso; Carlos Martins; Amanda Vasconcelos; Andressa Ferraresi; Julia Maziero** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 07/05/2019.

We certify that the proposal "Investigation of the relationship between immune-mediated diseases vs. neurological symptoms and cognitive impairments.", utilizing 2720 Heterogenics mice (males or females), 960 Isogenics mice (males or females), protocol number CEUA 3914220319 (ID 001242), under the responsibility of **Rafael Cypriano Dutra and team; Eduarda Gomes Ferrarini; Elaine Cristina Dalazen Gonçalves; Jaíne Ferrareis Menegasso; Carlos Martins; Amanda Vasconcelos; Andressa Ferraresi; Julia Maziero** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 05/07/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 05/2019 a 05/2028      Área: Ciências da Saúde

Origem:	Biotério Central			
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Machos ou Fêmeas	idade: 60 a 90 dias      N: 2720
Linhagem:	Swiss			Peso: 30 a 50 g
<hr/>				
Origem:	Biotério Externo			
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos ou Fêmeas	idade: 60 a 90 dias      N: 960
Linhagem:	C57BL/6			Peso: 25 a 40 g

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Autoimunidade e Imunofarmacologia (LAIF).

Florianópolis, 15 de maio de 2019

Prof. Dr. Aderbal Silva Aguiar Junior  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima  
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Catarina