

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

LAURA DE ROCH CASAGRANDE

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM ULTRASSOM PULSADO DE
BAIXA INTENSIDADE TRANSCRANIANO ASSOCIADO AS
NANOPARTÍCULAS DE OURO EM UM MODELO DE DOENÇA DE
ALZHEIMER**

**CRICIÚMA
NOVEMBRO, 2023**

LAURA DE ROCH CASAGRANDE

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM ULTRASSOM PULSADO DE
BAIXA INTENSIDADE TRANSCRANIANO ASSOCIADO AS
NANOPARTÍCULAS DE OURO EM UM MODELO DE DOENÇA DE
ALZHEIMER**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção
do Título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientador: Prof^ª. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira

**CRICIÚMA
NOVEMBRO, 2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C334e Casagrande, Laura de Roch.

Efeitos do tratamento com ultrassom pulsado de baixa intensidade transcraniano associado as nanopartículas de ouro em um modelo de doença de Alzheimer / Laura de Roch Casagrande. - 2023.

51 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2023.

Orientação: Paulo Cesar Lock Silveira.

1. Ultrassom pulsado - Uso terapêutico. 2. Nanopartículas de ouro - Uso terapêutico. 3. Alzheimer, Doença de - Tratamento. 4. Neuroinflamação. 5. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD 23. ed. 615.8323

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



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE Mestrado em Ciências da Saúde – Nº 422

Com início às 13 (treze) horas e 30 (trinta) minutos do dia 08 (oito) de dezembro de 2023 (dois mil e vinte e três), realizou-se, na Sala 208/Bloco R1, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **LAURA DE ROCH CASAGRANDE**, sob a orientação do **Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira**, intitulada **“EFEITOS DO TRATAMENTO COM ULTRASSOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE TRANSCRANIANO ASSOCIADO AS NANOPARTÍCULAS DE OURO EM UM MODELO DE DOENÇA DE ALZHEIMER”**. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Jaqueline da Silva Generoso (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Profa. Dra. Fabricia Cardoso Petronilho (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, e Profa. Dra. Jade de Oliveira (Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Os trabalhos foram concluídos às 16h (dezesseis) horas, dos quais eu, Samiris Albano Pereira, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Emilio Luiz Streck, Coordenador do Programa. Criciúma, 08 (oito) de dezembro de 2023 (dois mil e vinte e três).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Samiris Albano Pereira
Secretária

FOLHA INFORMATIVA

Dissertação elaborada seguindo o estilo ABNT com adaptações descritas na resolução n. 7/2015 do Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Este trabalho é apresentado no formato tradicional e foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

AGRADECIMENTOS

Hoje com mais maturidade, tenho a certeza de que Deus me permitiu e me sustentou para que eu chegasse até aqui. Afinal, ele colocou no meu caminho pessoas que me fizeram ser quem eu sou hoje. Eu só posso ser grata por tudo que tenho na minha vida.

Eu gostaria de dedicar esse trabalho à minha mãe, Sandrina, meu pai, Amarildo, meu irmão, Eduardo. Meu sonho era que minha história fosse construída e reconhecida individualmente quando iniciei a graduação e o mestrado. Com o passar do tempo, reconheci que minha família era parte de mim, dos meus sonhos e sempre vai ser. Obrigada por terem sido minha base, meu suporte e por estarem presentes em absolutamente tudo na minha vida. Eu me sinto muito mais forte e corajosa porque tenho o amor de vocês. Eu sei que posso voar mais alto porque tenho vocês ao meu lado, sempre.

Um agradecimento especial à minha cunhada, Dolores e minha sobrinha, Rafaela. São presentes que o universo enviou a minha vida. Sou mais feliz por ter vocês ao meu lado, obrigada por todo apoio sempre. Acima de qualquer coisa, de qualquer riqueza, minha família é tudo de mais precioso que tenho.

Sou grata também ao meu namorado, Germano, que chegou na minha vida como um grande amigo e colega de laboratório, com seu coração empático me conquistou e permaneceu na minha vida após anos de tentativa (brincadeiras a parte). Obrigada por ser meu parceiro de vida, por me fazer feliz. Espero dividir todas as minhas conquistas com você.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Silveira, por todos esses anos de orientação, por todos os aprendizados, críticas construtivas e conselhos intermináveis na cantina, não tive só um orientador ao meu lado tive um grande amigo que me guiou e me apresentou um mundo de possibilidades no mundo da ciência. O Paulo nos ensina a amar a ciência, amar o que faz e sua paixão pelo trabalho nos motiva a continuar. Obrigada por ter me desafiado tantas vezes e ter acreditado em mim. Tenho orgulho de ser orientada por você e fazer parte do grupo de Proteção e Reparo tecidual.

Um agradecimento mais que especial a professora Josiane Budni, por toda sua serenidade e disponibilidade, e ao seu grupo de pesquisa em Doenças Neurodegenerativas, pela parceria e toda ajuda ofertada para que esse trabalho acontecesse. Em especial, a aluna de doutorado: Eduarda Behenck, minha fada e minha colega de profissão, por todo apoio e ajuda desde a ideia do projeto, até a parte experimental e escrita. Ela me acalmou nos momentos que mais precisei e acreditou que tudo daria certo no fim, meu MUITO obrigada!

Nada se constrói sozinho, e esse trabalho não foi diferente. Tive o apoio e ajuda de um grande grupo de pesquisa, que me ensina a cada dia que passa. E eu com toda a sorte do mundo, criei laços que levarei para uma vida toda. Meus mais sinceros agradecimentos a Maria Eduarda, Gustavo, Carolini, Daniela, João, Matheus Rodrigues, levo uma parte dos ensinamentos de vocês comigo. Além de grandes amigos, desempenham um papel brilhante como profissionais. Por fim, o universo me enviou duas colegas de profissão, colegas de laboratório que se tornaram minhas irmãs de coração, minha família em Criciúma quando eu precisei, responsáveis pelos meus momentos de alegria genuína, Rubya e Ligia nosso elo é eterno, obrigada por tudo.

E por último, e claro, não menos importante: agradeço imensamente aos meus colegas de laboratório, Mateus Colares e minhas ‘crianças’, alunos de iniciação científica do nosso grupo. Dentre eles; Camila, Igor, e Alice por todo apoio durante esse tempo, por serem minhas companhias diárias e dividirem comigo muitos aprendizados.

A todos os funcionários da UNESC e do Biotério que também foram responsáveis por esse trabalho acontecer, meu muito obrigada.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (Fapesc), pela concessão da bolsa de estudos para a realização do mestrado.

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma patologia que se desenvolve de forma progressiva e irreversível. Novas estratégias terapêuticas são necessárias para o tratamento da DA. O ultrassom pulsado de baixa intensidade (UPBI) é uma terapia não invasiva, de baixo custo, que estimula áreas específicas do cérebro. As nanopartículas de ouro (GNPs) são moléculas promissoras no tratamento de doenças neurodegenerativas devido suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do tratamento do UPBI associado as GNPs no aprendizado, memória e neuroinflamação em um modelo animal de DA induzido pela administração do peptídeo β -amilóide (βA_{1-42}) em camundongos. Foram utilizados no total 60 camundongos machos com 90 dias de vida. O peptídeo βA_{1-42} ou líquido cefalorraquidiano artificial (ACSF) (400 pmol/ml) foi inoculado intracerebroventricular nos camundongos BalbC, e o tratamento foi iniciado 24 horas após. Os animais receberam o tratamento com GNPs via intranasal (25 μ g/ml) e UPBI (dose 0.8 W/cm²) com frequência de 1.0 MHz por 17 dias com intervalo de 48 horas. Os animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais (n=12): 1-ACSF; 2- βA_{1-42} ; 3- βA_{1-42} +UPBI; 4- βA_{1-42} +GNPs; 5- βA_{1-42} +UPBI+GNPs. Nos dias 11° e 12° após inoculação os animais foram submetidos ao teste de campo aberto, no dia 13° ao teste Y maze, e a partir do dia 14° a 18° ao teste do labirinto radial. Logo após os testes comportamentais, no dia 19°, todos os grupos foram eutanasiados para a coleta do córtex pré-frontal, hipocampo, fígado e posteriormente análises bioquímicas e histológicas. Na análise histológica de fígado não foi observado em nenhum dos grupos experimentais a presença de infiltrado inflamatório. Os comportamentos demonstraram que houve danos de aprendizagem e memória nos grupos que receberam o peptídeo βA_{1-42} , exceto no teste de campo aberto. No teste Y maze, apenas os grupos com terapias isoladas reverteram os déficits de memória de curto prazo. Já no teste de labirinto radial, todos os grupos apresentaram reversão dos déficits de memória. Na análise de fatores neurotróficos, no hipocampo e no córtex pré-frontal, todos os grupos tratados tiveram um aumento significativo do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em comparação ao grupo βA_{1-42} . Nas análises de citocinas pró-inflamatórias, no córtex pré-frontal houve uma diminuição das citocinas interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) em todos os grupos tratados em comparação com o grupo βA_{1-42} . No hipocampo, todos os grupos tratados provocaram uma redução significativa nos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-1 β em relação ao grupo βA_{1-42} . Além disso, houve um aumento significativo da citocina anti-inflamatória interleucina 10 (IL-10) em todos os grupos em relação ao grupo βA_{1-42} , no hipocampo. Na análise de óxido nítrico (NO), no hipocampo, houve uma diminuição significativa no grupo terapias associadas em relação ao grupo βA_{1-42} , com um aumento significativo da glutathiona reduzida (GSH) em todos os grupos tratados em relação ao grupo βA_{1-42} . No córtex pré frontal, o nitrito apresentou redução significativa em todos os grupos tratados em relação ao grupo βA_{1-42} , com concomitante aumento do GSH em todos os grupos em relação ao grupo βA_{1-42} . Na análise de RT-PCR houve um aumento da expressão gênica do fator Nuclear Kappa B (NF κ B) no hipocampo e todos os grupos tratados diminuíram esses achados em comparação ao grupo βA_{1-42} . Na expressão gênica da proteína precursora amilóide (APP), apenas o grupo βA_{1-42} +UPBI demonstrou uma diminuição dessa proteína. Os resultados demonstraram que as terapias isoladas tiveram uma melhor efetividade nos testes comportamentais. No entanto, o grupo associado demonstrou uma tendência a um maior potencial terapêutico e neuroprotetor, quando analisados os parâmetros de comportamento e análises bioquímicas.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; Ultrassom pulsado de baixa intensidade; nanopartículas de ouro; neuroinflamação, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is a pathology that develops progressively and irreversibly. New therapeutic strategies are needed for the treatment of AD. Low-Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) is a low-cost, non-invasive therapy that stimulates specific areas of the brain. Gold nanoparticles (GNPs) are important molecules in treating neurodegenerative diseases due to their antioxidant properties. This study aimed to evaluate the treatment of LIPUS associated with GNPs in the learning, memory, and neuroinflammation in an animal model of AD induced by administration of the βA_{1-42} peptide in mice. A total of sixty 90-day-old male mice were used. βA_{1-42} peptide (400 pmol) or intracerebroventricular saline gel was induced in the balbC animals, and treatment started 24 hours later. The animals received treatment with GNPs intranasally (25 μ g/mL) and LIPUS (dose 0.8 W/cm²) at a frequency of 1.0 MHz for 17 days with an interval of 48 hours. Animals were distributed into five experimental groups (n=12): 1- ACSF; 2- βA_{1-42} ; 3- βA_{1-42} + LIPUS; 4- βA_{1-42} + GNPs; 5- βA_{1-42} + LIPUS + GNPs. On days 11 and 12, the animals were subjected to the open field test, on day 13 to the Y maze test, and on days 14 to 18 to the radial maze test. Shortly after the behavioral tests, on day 19, all the groups were euthanized with the removal of the cortex, hippocampus, and liver for later biochemical and histological analyses. In the histological analysis of the liver, the presence of inflammatory infiltrate was not observed in any of the experimental groups. The behavior tests demonstrated that there was an induction of dementia in the groups in which the βA_{1-42} peptide was induced, except in the open-field test. In the Y maze test, only groups with isolated therapies reversed short-term memory deficits. In the radial maze test, all groups were able to reverse memory deficits. In the analysis of neurotrophic factors, in the prefrontal cortex and hippocampus, all treated groups had a significant increase in BDNF compared to the βA_{1-42} group. In the analysis of pro-inflammatory cytokines, in the prefrontal cortex, there was a decrease in the cytokines IL-1 β and IL-6 in all treated groups compared to the βA_{1-42} group. In the hippocampus, all treated groups caused a significant reduction in the levels of TNF- α and IL-1 β compared to the βA_{1-42} group. Furthermore, there was a significant increase in the anti-inflammatory cytokine IL-10 in all groups compared to the βA_{1-42} group, in the hippocampus. In the analysis of NO in the hippocampus, there was a significant decrease in the associated therapies group in relation to the βA_{1-42} group, with a significant increase in GSH in all treated groups in relation to the βA_{1-42} group. In the cortex, nitrite showed a significant reduction in all treated groups in relation to the βA_{1-42} group, with a concomitant increase in GSH in all groups in relation to the βA_{1-42} group. In the PCR analysis, there was a significant increase in the NF κ B gene expression in the hippocampus and all treated groups reduced these findings when compared to the βA_{1-42} group. In APP gene expression, only the βA_{1-42} + LIPUS group demonstrated a decrease in this protein. The results demonstrated that isolated therapies had better effectiveness in behavioral tests, however, the associated group demonstrated a tendency towards greater therapeutic and neuroprotective potential when analyzing behavioral parameters and biochemical analyses.

Keywords: Alzheimer's disease; Low intensity pulsed ultrasound; gold nanoparticles; neuroinflammation, oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Avanço da Taupatia, deposição de βA e morte neuronal, no decorrer do tempo. Observa-se a evolução da doença de acordo com a gravidade, a taupatia, a deposição de βA e a morte neuronal. O peptídeo βA é o primeiro sinal cerebral, e surge antes mesmo dos primeiros sinais e sintomas da doença, seguido de hiperfosforilação da Tau, apresentada apenas no estágio leve à moderado da doença. Fonte: Adaptado de García-Morales et al., 2021 16
- Figura 2** - Linha do tempo experimental. Fonte: elaborado pelo autor. 29
- Figura 3** - (A) Análise de absorbância das GNPs sintetizadas com curcumina; em (B) a microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas com curcumina. 35
- Figura 4** - Efeitos do tratamento com UPBI e/ou GNPs sobre a análise histológica com coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) no fígado (n-5 animais/grupo). Em A infiltrado inflamatório; em B número médio de infiltrado inflamatório. Os dados são expressos como média \pm SEM. 36
- Figura 5** - Efeitos do tratamento com UPBI e GNPs sobre os dados do teste comportamental do Labirinto em Y em camundongos BalbC (n-12 animais/grupo). Os dados são expressos como média \pm SEM. (* $p < 0,05$) e quando comparado à sessão treino no mesmo grupo experimental. Seguido do teste T de Student para amostras pareadas. 37
- Figura 6** - Efeitos do tratamento com UPBI e GNPs sobre os dados do teste comportamental no labirinto radial em camundongos BalbC (n-12 animais/grupo). Os dados mostram o tempo (A) e o número de erros (B) para encontrar a recompensa. Os dados são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ quando comparado ao primeiro dia de experimento. (ANOVA de uma via de medidas repetidas, seguido do teste de post hoc Tukey). 38
- Figura 7** - Efeitos do tratamento com UPBI e GNPs sobre os dados do teste comportamental do Campo Aberto em camundongos BalbC (n-12 animais/grupo). Os dados mostram o número de cruzamentos em (A), e o número de levantamentos em (B). Os dados são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ quando comparado à sessão treino no mesmo grupo experimental. Seguidos do teste T de Student para amostras pareadas. 39
- Figura 8** - Efeitos do tratamento com UPBI e GNPs sobre níveis de fatores neurotróficos no córtex avaliados 19 dias após indução de βA_{1-42} , (n-7 animais/grupo). Nos gráficos são apresentados as avaliações de BDNF em A, NGF em B. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s βA_{1-42} ; ** $p < 0,01$ v.s βA_{1-42} ; # $p < 0,05$ v.s Grupo ACSF (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey). 40
- Figura 9** - Efeitos do tratamento com UPBI e GNPs sobre níveis de fatores neurotróficos no hipocampo avaliados 19 dias após indução de βA_{1-42} , (n-7 animais/grupo). Nos gráficos são apresentados as avaliações de BDNF em A, NGF em B. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s βA_{1-42} ; # $p < 0,05$ v.s Grupo ACSF (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey). 41
- Figura 10** - Efeitos do tratamento com UPBI e GNPs sobre parâmetros de expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias do córtex avaliados 19 dias após indução de βA_{1-42} (n-7 animais/grupo). Nos gráficos são apresentadas as avaliações de TNF- α em A, IL-1 β em B, IL-6 em C e IL-10 em D. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual:

*p<0,05 v.s β A1-42; **p<0,01 v.s β A1-42; #p<0,05 v.s Grupo ACSF (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).	42
Figura 11 - Efeitos do tratamento com UPBI e GNPs sobre parâmetros de expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias do hipocampo avaliados 19 dias após indução de β A ₁₋₄₂ (n-7 animais/grupo). Nos gráficos são apresentados as avaliações de TNF- α em A, IL-1 β em B, IL-6 em C e IL-10 em D. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: *p<0,05 v.s β A1-42; **p<0,01 v.s β A1-42; #p<0,05 v.s Grupo ACSF (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).	43
Figura 12 - Efeitos do tratamento com UPBI e GNPs sobre parâmetros de expressão gênica dos marcadores Nf-k β e APP no hipocampo avaliados 19 dias após indução de β A ₁₋₄₂ (n-7 animais/grupo). Nos gráficos são apresentadas as avaliações de Nf-k β em A e APP em B. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: *p<0,05 v.s β A1-42; **p<0,01 v.s β A1-42; #p<0,05 v.s Grupo ACSF (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).	44
Figura 13 - Efeitos do tratamento com UPBI e GNPs sobre parâmetros oxidativos no córtex avaliados 19 dias após indução de β A ₁₋₄₂ (n-7 animais/grupo). Nos gráficos são apresentados as avaliações de NO em A, e GSH em B. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: *p<0,05 v.s β A1-42; **p<0,01 v.s β A1-42; ***p<0,001 v.s β A1-42; (DA) #p<0,05 v.s Grupo ACSF (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).	45
Figura 14 - Efeitos do tratamento com UPBI e GNPs sobre parâmetros oxidativos no hipocampo avaliados 19 dias após indução de β A ₁₋₄₂ (n-7 animais/grupo). Nos gráficos são apresentados as avaliações de NO em A, e GSH em B. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: *p<0,05 v.s β A1-42; **p<0,01 v.s β A1-42; ***p<0,001 v.s β A1-42; (DA) #p<0,05 v.s Grupo ACSF (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).	46
Figura 15 - Síntese dos principais achados sobre as terapias com UPBI e GNPs no tratamento para a DA. Fonte: elaborado pelo próprio autor.	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ACSF – Líquido cefalorraquidiano artificial
APP - Proteína precursora amilóide
ATP - Adenosina Trifosfato
BACE1 - Proteína mRNA β -secretase
BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BHE - Barreira hematoencefálica
DA - Doença de Alzheimer
DAMPs - Padrões moleculares associados a danos
DP - Doença de Parkinson
ERO -Espécies Reativas de Oxigênio
GFAP- Proteína ácida fibrilar glial
GNPs - Nanopartículas de ouro
GPX - Glutathione Peroxidase GSH Glutathione
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- γ - Interferon Gama
IGF-1 - Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
IL-1 β - Interleucina 1 beta
IL-4 - Interleucina 4
IL-6 - Interleucina 6
IL-10 - Interleucina 10
LPS - Lipopolissacarídeo
MAPK - Proteína cinase ativada por mitógenos
MDA - Malondialdeído
MEC - Matriz extracelular
NF κ B - Factor Nuclear Kappa B
NGF - Fator de crescimento nervoso
NO - Óxido nítrico
NTF - Emaranhados neurofibrilares
OMS - Organização Mundial de Saúde
PAMPs -Padrões moleculares associados a patógenos
PPRs - Receptores de reconhecimento de padrões
ERN - Espécies reativas de nitrogênio

SNC - Sistema nervoso central

TGF- β - Fator de crescimento transformador

TLR - Receptores do tipo Toll

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

UPBI - Ultrassom pulsado de baixa intensidade

β A - Peptídeo β -Amilóide

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	DOENÇA DE ALZHEIMER	15
1.2	INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA DE ALZHEIMER ...	17
1.3	ULTRASSOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE	20
1.4	NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	22
1.5	CURCUMINA	23
2	OBJETIVOS.....	26
2.1	OBJETIVO GERAL	26
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	26
3	METODOLOGIA	27
3.1	ASPECTOS ÉTICOS	27
3.2	ANIMAIS	27
3.3	ADMINISTRAÇÃO βA_{1-42}	27
3.4	TRATAMENTO	28
3.5	SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO	29
3.6	ULTRASSOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE	29
3.7	TESTES COMPORTAMENTAIS	30
3.7.1	Teste do campo aberto.....	30
3.7.2	Labirinto em Y (<i>Y-maze</i>)	30
3.7.3	Labirinto octogonal (<i>Radial Maze</i>).....	31
3.8	EUTANÁSIA.....	31
3.9	HISTOLOGIA	32
3.10	IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO	32
3.11	RT-PCR	33
3.12	ENSAIOS BIOQUÍMICOS	33
3.12.1	Indicador da Formação de Óxido Nítrico (NO).....	33
3.12.2	Níveis de Glutathiona (GSH)	33
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4	RESULTADOS	35
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS GNPS.....	35
4.2	HISTOLOGIA	35
4.3	TESTES COMPORTAMENTAIS	36

4.4	FATORES NEUROTRÓFICOS.....	39
4.5	AVALIAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS 41	
4.6	RT-PCR	43
4.7	MARCADOR DE ERN E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	44
5	DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÃO	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

As projeções estatísticas da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam que, no período de 1950 a 2025, a população de idosos do Brasil deverá ter aumentado em 15 vezes, enquanto o restante da população terá aumentado em cinco. Assim, o Brasil será o 6º país quanto ao contingente de idosos em 2025 devendo ter aproximadamente 32 milhões de pessoas com mais de 60 anos. (Cerqueira, 2002). Com o aumento intenso do envelhecimento no país, ocorre simultaneamente um aumento de doenças de natureza crônica, degenerativa e incapacitantes. De acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a parcela da população que mais utiliza os serviços de saúde, são os idosos. Tal cenário representa um grande desafio no campo das políticas públicas, uma vez que os cuidados com a pessoa idosa requerem recursos financeiros para que haja ambientes adequados, profissionais capacitados para atender as necessidades fisiopatológicas e psicossocial desses indivíduos (IBGE, 2018).

A medida que a expectativa de vida se torna mais elevada, tem-se observado um aumento da prevalência da doença de Alzheimer (DA). A OMS estima que cerca de 55 milhões de pessoas tenham algum tipo de demência, sendo a mais comum a DA, que atinge sete entre dez indivíduos nessa situação em todo o mundo. Estima-se que o número de pessoas que vivem com demência triplique – de 55 milhões para 139 milhões até 2050. Os dados revelam a magnitude do problema no Brasil, onde cerca de 1,2 milhões de pessoas são acometidas com DA. O cenário atual mostra que a doença caracteriza uma crise global de saúde (OMS, 2021).

A DA é uma doença neurodegenerativa cujo curso desenvolve-se de forma progressiva e irreversível, é a forma mais comum de demência na população idosa, desenvolvendo-se principalmente em indivíduos com mais de 65 anos. (Doroszkiwicz et al., 2022) Em geral, a demência pode ser definida como uma síndrome clínica caracterizada por um conjunto de sintomas e sinais manifestados pela perda de memória, distúrbios na linguagem. À medida que a patologia evolui, há um declínio da função cognitiva, mudanças de comportamento e prejuízos nas atividades de vida diária. No último estágio da doença o indivíduo torna-se profundamente incapacitado, mudo e imóvel (Qiu et al., 2022).

Atualmente o entendimento da etiologia da DA ainda é um grande desafio, entretanto sabe-se que a DA tem sido considerada uma doença multifatorial associada a vários fatores de

riscos importantes. O surgimento da doença é resultado de diferentes fatores ambientais e genéticos que acontecem ao longo da vida do indivíduo. Além disso, existem os fatores de risco relacionados à doença que podem envolver: doenças vasculares, traumatismo craniano, infecções, inflamação sistêmica, obesidade e depressão. Todavia, o principal fator de risco é o envelhecimento, sendo que a sua incidência aumenta conforme a idade (Breijyeh et al., 2020; Qiu et al., 2022).

A DA caracteriza-se histopatologicamente pela perda maciça de neurônios colinérgicos na região do córtex e hipocampo, regiões responsáveis pelas funções cognitivas; além disso, essa perda neuronal está associada a destruições de sinapses e conexões importantes na região do cérebro. Adicionalmente, a DA é caracterizada pelo aumento da deposição de placas de β -Amilóide (β A) de forma extracelular e conseqüentemente na formação de emaranhados neurofibrilares (NTF) intraneurais de proteína tau hiperfosforilada. A fosforilação da proteína Tau causa um desequilíbrio no funcionamento fisiológico dos neurônios, pois em condições normais, essas proteínas são responsáveis pela polimerização e estabilização dos microtúbulos, transporte de diversas enzimas e outras organelas ao longo do citoesqueleto celular, além de promover o crescimento dos neurônios. No cérebro de paciente com DA, as junções desses acontecimentos contribuem para a perda neuronal, disfunção sináptica e neurônios doentes na região cerebral (Figura 1) (Rubio et al., 2012; Hampel et al., 2021).

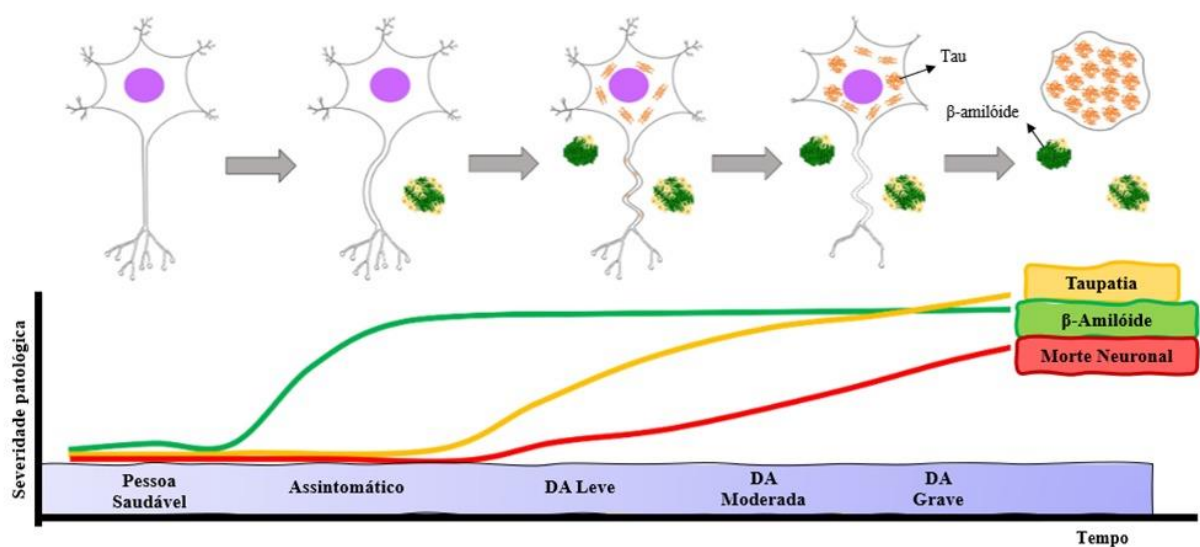


Figura 1: Avanço da Taupatia, deposição de β A e morte neuronal, no decorrer do tempo. Observa-se a evolução da doença de acordo com a gravidade, a taupatia, a deposição de β A e a morte neuronal. O peptídeo β A é o primeiro sinal cerebral, e surge antes mesmo dos primeiros sinais e sintomas da doença, seguido de hiperfosforilação da Tau, apresentada apenas no estágio leve à moderado da doença. Fonte: Adaptado de García-Morales et al., 2021

O peptídeo β A é produzido pela quebra da proteína precursora amilóide (APP) que é uma glicoproteína transmembrana tipo I presente na membrana de neurônios. A APP é processada enzimaticamente pelas secretases α , β e γ para liberar várias formas de peptídeo β A. As secretases são enzimas responsáveis pelo processo proteolítico normal da APP, levando à formação de fragmentos β A. Dependendo do sítio de proteólise estas enzimas são classificadas entre α , β e γ -secretases. As α -secretases são, provavelmente, fixadas à membrana plasmática e clivam a APP entre os resíduos 16 e 17 da sequência do β A, gerando fragmentos extracelulares solúveis conhecidos como sAPP α , que são normalmente fagocitados pelas microglias e eliminados (Bettens et al., 2010; Vassar et al., 2014).

Portanto, quando a proteólise da APP ocorre por ação de β e γ -secretases, ocorre liberação de fragmentos insolúveis de β A. As γ -secretases podem quebrar APP, originando peptídeos β A que variam de 39 a 43 resíduos de aminoácidos, sendo o resíduo β A1-40 formado em maior quantidade. Mais de 90% da APP são clivadas pela α -secretase no estado fisiológico normal, e os 10% restantes são clivadas e processadas pelas β e γ -secretases, produzindo assim os peptídeos insolúveis como β A1-42 e β A1-43, que apesar de minoritários, são as formas mais encontradas em placas cerebrais e estão fortemente relacionados com a progressão da DA (Sajad et al., 2022).

O aumento dos agregados do peptídeo β A dos NFT resultarão em ativação de vias neurotóxicas como morte celular por apoptose e necrose, estresse oxidativo, excitotoxicidade glutamatérgica, diminuição de fatores neurotróficos e neuroinflamação (Gorthi et al., 2023). Esses processos fisiopatológicos importantes na DA contribuem para a atrofia e perda neuronal no cérebro, disfunção sináptica, disfunção mitocondrial e deficiência da homeostase do Ca^{2+} explicada pela atividade excitotóxica. Esses eventos tomados em conjunto, estão intimamente ligados a sintomatologia e no desenvolvimento do processo inflamatório não resolvido em indivíduos com DA (Marei et al., 2016).

1.2 INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA DE ALZHEIMER

Embora a inflamação seja uma resposta protetora do organismo, um processo inflamatório quando ocorre de forma excessiva pode causar ou contribuir para danos nos tecidos ou agravar uma determinada patologia. Além do acúmulo das placas amilóides e NFT, a neuroinflamação na DA é caracterizada pela ativação de células gliais (microglias e astrócitos). As células gliais são células responsáveis pela resposta inflamatória no sistema nervoso central (SNC). Essas células são consideradas os macrófagos residentes do SNC e representam cerca

de 10% da população do SNC, desempenham um papel crucial, não só na neurogênese, plasticidade neuronal e regeneração, mas também como primeira linha de defesa imunitária em caso de qualquer tipo de lesão cerebral. Em adição, as micróglia têm a capacidade fagocitária, liberam fatores citotóxicos e podem ser células apresentadoras de antígenos. Na ausência de estímulos estranhos, as células micróglia estão em estado de repouso ou inativadas; quando ativadas, passam por alterações morfológicas, convertendo sua forma em ameboide ativado e móvel, capaz de atingir o local da lesão (Calsolaro et al., 2016; Tang et al., 2016).

Em condições normais a micróglia expressa todos os receptores similares a *Toll* (TLR) em baixa quantidade. Entretanto, após a ativação, a expressão desses receptores aumenta possibilitando à micróglia reconhecer neurotoxinas e a partir disso induzir a produção de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), levando a ativação do inflamassoma NLRP-3, aumentando o nível de IL-1 β e outras citocinas pró-inflamatórias que contribuem para a progressão da DA (Md et al., 2021). Curiosamente, o inflamassoma ativado, além da neuroinflamação, também induz a fosforilação da proteína tau e auxilia na produção de NFT. Assim, o inflamassoma NLRP-3 é um elo entre a hiperfosforilação β A e tau, confirmando o seu envolvimento na neuroinflamação e na DA (Yang et al., 2020).

A neuroinflamação se resume em um ciclo vicioso, no qual o β A estimula a micróglia a partir de diversas vias, como a via dependente de NF κ B e a via da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK), o que resulta na liberação de citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, o estado inflamatório exacerbado estabelecido contribui para a disfunção e morte de células do SNC (Liu et al., 2023). Além de um efeito neurotóxico direto, a ativação das células gliais podem promover a deposição de β A, diversos estudos em modelos de camundongos mostraram que a deposição de β A é aumentada em condições inflamatórias (Guo et al., 2002; Chen et al., 2002). Ademais, as citocinas são capazes de regular positivamente a atividade enzimática e a proteína mRNA β -secretase (BACE1), uma enzima chave na formação de β A neuronal e cuja transcrição também parece ser aumentada pela ativação do NF κ B e pela citocina TNF- α , resultando em aumento da produção de β A (Chen et al., 2012).

No cérebro de pacientes com DA, a micróglia pode ser ativada através de oligômeros solúveis de β A, fibrilas ou lipopolissacarídeo (LPS) ligando-se aos receptores de reconhecimento de padrões (PPRs). Dependendo do meio em que são ativadas ou dos fatores pelos quais são estimuladas, a micróglia possui estados de “ativação clássica”, “ativação alternativa” e “desativação adquirida”. A micróglia M1 está associada a ativação clássica e à produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , superóxido, óxido nítrico (NO),

espécies reativas de oxigênio (ERO) e proteases, enquanto a micróglia M2 é associada aos estados de ativação alternativa e desativação adquirida. A ativação alternativa é limitada ao estado de ativação pelas citocinas como Interleucina 4 (IL-4) ou Interleucina 13 (IL-13) e está intimamente relacionada a genes M2 que promovem um ambiente anti-inflamatório, reconstrução da matriz extracelular (MEC) e conseqüentemente, reparo tecidual. A desativação adquirida é outro estado para promover o controle do processo inflamatório agudo e é induzida pela captação de células apoptóticas ou citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e fator de crescimento transformador (TGF- β) (Tang et al., 2016; Kwon et al., 2020).

Além do papel da micróglia na neuroinflamação, encontra-se outra célula com função importante neste processo, os astrócitos, que são expressos pelo aumento da liberação da proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Os astrócitos desempenham vários papéis na manutenção da homeostase do cérebro, incluindo a regulação da homeostase de neurotransmissor, sustentação, controle da composição iônica e molecular do ambiente onde estão localizados os neurônios. Porém, apesar de apresentarem função neuroprotetora, também podem contribuir com um ambiente pró-inflamatório. O envolvimento dos astrócitos na neuroinflamação está relacionado com a ativação do NF κ B, liberando a proteína C3 do complemento que se liga ao C3aR neuronal. Além disso, essa ativação ocasiona a liberação de uma série de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, promovendo acúmulo da β A, disfunção da micróglia e danos aos neurônios se tornando um ciclo vicioso (Akiyama et al., 2000; Doroszkiewicz et al., 2022).

Na DA o acúmulo de β A e a resposta inflamatória exacerbada são capazes de promover a neurodegeneração através de vários mecanismos, incluindo a disfunção mitocondrial, que resulta em produção de radicais livres. O estresse oxidativo desempenha um papel significativo na patogênese da DA. O equilíbrio entre a produção de EROs e das defesas antioxidantes é essencial para a função celular normal. No entanto, na DA, a atividade das enzimas antioxidantes é alterada, contribuindo assim para o acúmulo irrestrito de dano oxidativo. Quando desequilibrada, a superprodução de EROs combinada com a defesa antioxidante insuficiente leva ao quadro de estresse oxidativo (Chen et al., 2014).

Um dos efeitos do estresse oxidativo é a possibilidade de causar danos moleculares, que podem ocorrer no DNA, em proteínas, carboidratos, e lipídeos. A nível cerebral foi relatado que o aumento da produção de EROs e o agravamento do quadro de estresse oxidativo induzem a autofagia, um processo homeostático que permite que as células degradem proteínas e organelas citoplasmáticas (Kamat et al., 2016). O NO liberado pela NO sintase pode induzir alterações sinápticas e causar neurotoxicidade. Estudos sugeriram que a geração de espécies reativas de nitrogênio (ERN) e EROs desencadeia estresse oxidativo e, eventualmente, leva a

danos neuronais. Assim, o aumento da geração de radicais livres pode levar à disfunção sináptica, que é um importante componente fisiopatológico da DA. Ademais, sugerem que o estresse oxidativo causa deficiência cognitiva, alterações patológicas como o NFT e danos celulares como visto na patologia da DA via hiperfosforilação da proteína tau (Liu et al., 2003; Kamat et al., 2013).

O acúmulo da β A e a disfunção mitocondrial desenvolvem um papel central no aumento do estresse oxidativo em portadores de DA. Os níveis aumentados de β A podem acelerar a produção de EROs ligando-se diretamente às membranas mitocondriais, com alteração da dinâmica e função mitocondrial, e consequente metabolismo energético anormal e perda da função sináptica. Além de que, o β A é capaz de inibir a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, reduzir a taxa respiratória e induzir a liberação de EROs, com neurotoxicidade causada pela produção direta dessas espécies reativas. Outra fonte de produção de EROs diretamente mediada por β A envolve a micróglia ativada no cérebro durante uma resposta inflamatória à deposição de placas amiloides extracelulares (Beal et al., 2005).

Os antioxidantes são definidos como compostos endógenos e exógenos, capazes de reduzir ou mesmo prevenir o impacto destrutivo das EROs e íons de metais por meio da interferência na cadeia de reações oxidantes nas células. Assim, podem intervir nos três estágios do processo de oxidação: iniciação, propagação ou término. O alto consumo de oxigênio e o relativo baixo nível de antioxidantes em doenças neurodegenerativas como a DA resultam em suscetibilidade do tecido cerebral ao dano oxidativo. Com isso, pode ocorrer uma redução na reparação desse prejuízo oxidativo, levando ao acúmulo de DNA alterados, os quais podem ser um importante fator na progressão da perda neuronal na doença de Alzheimer (Juszczak et al., 2021; Tönnies et al., 2017).

1.3 ULTRASSOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE

Atualmente os tratamentos existentes têm poucas evidências sobre progressão da doença. No entanto, novas terapias para DA são necessárias, e a estimulação cerebral não invasiva de áreas específicas do cérebro vem se mostrando uma terapia promissora. O UPBI é uma intervenção não farmacológica, não invasiva e de baixo custo que consiste na aplicação de ondas mecânicas em baixas intensidades, sendo transmitida através do meio para células e tecidos como ondas acústicas de alta frequência em uma determinada área cerebral. Quando uma corrente alternada é recrutada no cristal de quartzo presente no cabeçote do UPBI, ocorrem distorções de sua estrutura molecular e ele vibra produzindo ondas mecânicas idênticas às ondas

sonoras. A frequência das ondas é determinada pelo tamanho do cristal e pela frequência da corrente alternada (Natalia et al., 2021).

Na prática clínica o uso do UPBI teve seu início mais recente em tecidos moles e ósseos em relação ao uso em lesões cerebrais. Contudo, a literatura demonstra efeitos satisfatórios e promissores em doenças neurodegenerativas onde o processo de neuroinflamação encontra-se exacerbado e através dos efeitos do UPBI podem ser amenizados (Lin et al., 2015; Zortéa et al., 2015; Zheng et al., 2020). Estudos recentes demonstram a utilização do UPBI em modelos experimentais de isquemia e DA, resulta em aumento da expressão de neurotrofinas, que são proteínas que regulam a plasticidade do sistema nervoso adulto, promovendo a sobrevivência de neurônios e estimulando sua regeneração após lesão. Além disso, promovem a diminuição de lesões cerebrais, melhora no aprendizado, memória e induzem mudanças positivas na morfologia neuronal de roedores (Notturmo et al., 2014; Guo et al., 2015; Tramontin et al., 2021).

Os efeitos benéficos do UPBI são atribuídos a seus mecanismos não térmicos descritos recentemente na literatura através da pressão mecânica, radiação, força e cavitação, o que pode gerar uma abertura rápida e transitória da BHE. Isso permite que drogas, como as nanopartículas, acessem o cérebro sem causar danos secundários. A abertura da BHE permanece um desafio para o tratamento de doenças neurológicas devido ao seu acesso restrito e seletivo. A aplicação do UPBI combinado com o efeito de cavitação e formação de bolhas ao redor do tecido permite o deslocamento da parede do vaso e abre transitoriamente a junções estreitas da BHE de maneira segura, localizada, controlada e reversível (Wasielewska., 2022).

O UPBI também vem sendo empregado como uma terapia promissora na neuromodulação para estimular ou inibir reversivelmente a atividade do SNC. Em comparação com outras técnicas de neuromodulação, o UPBI apresenta vantagens como profundidade de penetração, não invasividade e orientação da onda mecânica no cérebro. Dessa forma, tornando o UPBI uma alternativa indolor, que pode oferecer especificidade em comparação às alternativas medicamentosas ou cirúrgicas. O efeito mecânico do UPBI é capaz de causar deformação da membrana lipídica e promover a abertura de canais iônicos por meio da cavitação que por sua vez gera um aumento de impulsos nervosos. Com isso, o UPBI pode alterar as propriedades viscoelásticas das membranas celulares do SNC, modulando a excitabilidade neuronal e a cinética de ativação dos receptores membranares (Wasielewska et al., 2022).

O UPBI já demonstrou efeitos antioxidantes, diminuindo algumas espécies reativas (Zortéa et al., 2015). Além disso, Tramontin (2021) demonstraram que o UPBI foi capaz de

modular positivamente os fatores neurotróficos como o BDNF e fator de crescimento nervoso (NGF) cerebral. Ademais, outras aplicações já foram investigadas experimentalmente, como a inibição de respostas inflamatórias e neuromodulação, como o equilíbrio entre atividade da microglia M1 e M2 (pró e anti-inflamatória), diminuição de IL-10 e outras citocinas (Su et al., 2017).

1.4 NANOPARTÍCULAS DE OURO

A nanotecnologia é um dos principais focos das atividades de pesquisa, tendo sua aplicação reconhecida em diversas áreas e possui um potencial para impactar positivamente no sistema de saúde. O grande atrativo dos nanomateriais é o seu comportamento físico e químico, resultante do tamanho pequeno e dos efeitos que proporcionam quando comparados a uma partícula. Dentre as nanopartículas inorgânicas, as nanopartículas de ouro (GNPs) sem sido amplamente exploradas devido aos seus efeitos promissores antioxidantes e anti-inflamatórios (Pinho et al., 2022). As GNPs possuem propriedades singulares como o tamanho, distribuição, a morfologia e funcionalização da superfície, além de possuírem propriedades ópticas, eletrônicas, redox e catalítica. A aplicação das GNPs na área médica precisa ser controlada com precisão, uma vez que essas propriedades possuem influência direta das GNPs com o tecido biológico. Diante disso, a taxa de liberação intracelular de GNPs pode afetar diretamente os tecidos pela toxicidade, tudo isso vai depender da dose, tamanho, forma e/ou carga de superfície da molécula (Silveira et al., 2014).

As aplicações das GNPs têm aumentado consideravelmente devido a sua baixa citotoxicidade e alta capacidade de interação às células, com isto, são utilizadas clinicamente para melhorar o potencial das drogas, alterando a farmacocinética, biodistribuição e absorção celular (Silveira et al., 2014). Além disso, alguns autores postulam que as GNPs reduziram significativamente os níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β e promoveram um aumento de citocinas anti-inflamatórias quando associadas com ultrassom terapêutico e microcorrente em modelos de lesões epiteliais e musculares, com concomitante melhora na morfologia tecidual (Silveira et al., 2012; Da Rocha et al., 2020).

Atualmente há evidências crescentes mostrando a aplicação terapêutica das GNPs em doenças neurodegenerativas, devido a sua interação com a BHE, sua capacidade anti-inflamatória e potencial antioxidante. No entanto, os efeitos do uso das GNPs no cérebro em relação a doenças neurodegenerativas são pouco conhecidos. Diante disso, cabe ressaltar a importância de compreender seus mecanismos e efeitos uma vez que os tratamentos disponíveis

utilizando fármacos são pouco eficientes e possuem efeitos colaterais, prejudicando a qualidade de vida do indivíduo (Silveira et al., 2021). Um estudo de Hou et al (2020) usando GNPs reduzidas com GSH em um modelo de DA, observou que GNPs com tamanho de 3-4 nm inibiram a toxicidade e obtiveram efeito neuroprotetor contra β A. Segundo Tramontin (2020) foi possível observar que o tratamento com GNPs em um modelo de DA em animais induzida por por ácido ocaídico reduziu a hiperfosforilação da Tau e melhorou a função cognitiva. Adicionalmente, outro estudo também mostrou a capacidade das GNPs com pequenos diâmetros de cruzarem facilmente a BHE (Khan et al., 2020). As GNPs possuem interação direta com as β A, por meio da afinidade com os agregados fibrilares tornando-os em agregados mais enfraquecidos e incompletos impedindo que o emaranhado se forme. Evidências coletadas suportam que as GNPs atuam como uma chaperona química e estabilizadora cinética de proteínas alterando as conformações fibrilares mitigando a neurodegeneração. Esses estudos sugerem as GNPs como uma potente via terapêutica para doenças neurodegenerativas, em especial a DA, e os achados proporcionam grande fundamentação para estudos futuros com potencial inovador no uso das GNPs (Gao et al., 2017; Sanati et al., 2019).

1.5 CURCUMINA

A curcumina é um composto polifenol natural, extraído da planta túmerica (*Curcuma Longa L.*) popularmente conhecida por açafrão da terra. Atualmente, a curcumina vem sendo estudada por seus potenciais e prováveis benefícios sobre câncer, doenças neurodegenerativas, inflamatórias e cardiometabólicas (Patel et al., 2020). A curcumina vem se mostrando um composto seguro, barato e prontamente disponível que pode atravessar a BHE, atraindo pesquisadores para usá-la no tratamento de doenças neurodegenerativas (Mohammadi et al., 2022).

O efeito anti-inflamatório da curcumina já vem sendo bem elucidado na literatura. Esse efeito do composto foi comparado com diversos medicamentos, mostrando a curcumina uma molécula terapêutica promissora. Em modelos de cicatrização de feridas em animais, o tratamento com curcumina exerceu benefícios através de mecanismos de ação relacionados à inibição da síntese de uma série de fatores inflamatórios como supressão de NOS e forte inibição da expressão gênica de TNF- α , MCP-1, IL-1 β e IL-6. Ademais, os mecanismos sugeridos dos efeitos benéficos da curcumina estão relacionados com o bloqueio da ação das EROs e inibição da ativação NF κ B, induzindo a produção de MEC, regulando positivamente as expressões de colágeno e fibronectina (Cho et al., 2007).

A curcumina é uma molécula pleiotrópica capaz de interagir com múltiplos alvos moleculares associados à inflamação. Regula a resposta inflamatória reduzindo a atividade da via enzimática induzível da óxido nítrico sintase (iNOS), lipooxigenase (LOX), fosfolipases A2 (PLA2s) e ciclooxigenase-2 (COX-2). Esta inibição dificulta a síntese de prostaglandinas pró-inflamatórias, leucotrienos e mediadores essenciais da resposta inflamatória. Além disso, a curcumina é conhecida por modular várias cascatas de sinalização celular incluindo PI3K, Akt, ERK5, TGF- β , STAT3, inflamassoma NLRP3, p38MAPK, Nrf2, AMPK que são responsáveis por regular várias atividades celulares, como expressão gênica, mitose, diferenciação, sobrevivência celular, apoptose, genes anti-inflamatórios e antioxidantes. (Karthikeyan, Senthil e Min, 2020).

Os efeitos neuroprotetores da curcumina vem sendo relatados em doenças neurodegenerativas como a DA e a DP. Estudos demonstraram que esse composto reduziu a formação da proteína β A ao intensificar a atividade de monócitos e macrófagos (Wang et al., 2010; Khosravi et al., 2023). A administração deste composto na DP foi estudada e os resultados demonstraram efeitos neuroprotetores. De fato, Jin et al. (2022) relatou que a curcumina foi capaz de melhorar a DP ativando a via de transdução BDNF/PI3k/Akt. A BHE tem um papel essencial no controle da homeostase do microambiente cerebral, assim, a curcumina pode atravessar a BHE e, ao inibir as citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, e a COX-2, proporciona efeitos terapêuticos ao reduzir as condições inflamatórias podendo regular a homeostase do SNC. Estudos evidenciaram que a curcumina oferece proteção a diversas células, abrangendo astrócitos, neurônios e micróglia, bem como distintas regiões do SNC, como o hipocampo, o mesencéfalo, o córtex e a medula espinal (Zhu et al., 2004; Ishrat et al., 2009).

Tal composto possui baixa disponibilidade, baixa solubilidade em água, o que gera rápida eliminação sistêmica apresentando boa absorção e rápida metabolização. Diversas modificações na estrutura molecular da curcumina foram realizadas para aumentar seu potencial terapêutico e sua solubilidade. Em decorrência disso, técnicas de entrega de drogas baseadas em nanopartículas são a melhor opção para expandir os usos medicinais da curcumina, já que esses materiais têm a capacidade de entrar nos tecidos e órgãos e translocar para outras células (Khosropanah et al., 2016).

Visto os efeitos benéficos do UPBI e das GNPs, acredita-se que essas terapias poderiam diminuir danos cerebrais: neuroinflamação, radicais livres e aumentar os níveis de neurotrofinas e citocinas anti-inflamatórias, além de diminuir prejuízos à memória. O objetivo deste estudo é compreender efeitos do uso do UPBI e das GNPs sobre um modelo experimental

de DA em camundongos BalbC afim de observar a eficácia do modelo e dos tratamentos utilizados de forma isolada e combinada juntamente com seus efeitos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento com UPBI e GNPs em um modelo de DA induzida por β_{A1-42} intracerebroventricular.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Quantificar o infiltrado inflamatório no fígado de camundongos BalbC submetidos a administração do peptídeo β_{A1-42} , tratados com UPBI e GNPs;
- Avaliar a aprendizagem e memória espacial de curta e de longa duração em camundongos BalbC submetidos a administração do peptídeo β_{A1-42} , tratados com UPBI e GNPs;
- Avaliar a memória de habituação de camundongos BalbC submetidos a administração do peptídeo β_{A1-42} , tratados com UPBI e GNPs;
- Avaliar os níveis de citocinas e de fatores neurotróficos (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, BDNF, NGF) presentes no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos BalbC submetidos a administração do peptídeo β_{A1-42} , tratados com UPBI e GNPs;
- Avaliar a expressão gênica de NF κ B e APP no hipocampo de camundongos BalbC submetidos a administração do peptídeo β_{A1-42} tratados com UPBI e GNPs.
- Avaliar a produção de oxidante (NO), níveis de GSH, presentes no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos BalbC submetidos a administração do peptídeo β_{A1-42} , tratados com UPBI e GNPs.

3 METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi submetido a Comissão Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, tendo todos os procedimentos em conformidade com as diretrizes brasileiras para o uso de animais com propósitos científicos e didáticos (Lei 11.794, DOU 27/5/13, MCTI, p.7) e aprovado sob o número do protocolo 59/2022 no dia 20 de setembro de 2022. (Anexo A).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 60 camundongos BalbC machos, adultos, pesando entre 30 a 35g com 3 meses de idade (90 dias) provindos da colônia de reprodução do Biotério da UNESC. Os animais foram alocados em grupos de até 05 camundongos por caixa moradia, com acesso à ração e água potável ad libitum (exceto para os dias nos quais foram realizados testes comportamentais que necessitam de racionamento de alimento), mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas (06:00 às 18:00) e em temperatura de 23 ± 1 °C. Os animais foram distribuídos randomicamente em 5 grupos experimentais com ‘n’ de 12 animais por grupo para análises bioquímicas, moleculares e testes comportamentais.

- Grupo 1- Líquido cefalorraquidiano artificial (ACSF);
- Grupo 2- βA_{1-42} (400 pmol);
- Grupo 3- βA_{1-42} + Ultrassom Pulsado de Baixa Intensidade (βA_{1-42} + UPBI); (1.0 MHz, 0.8 W/cm²);
- Grupo 4- βA_{1-42} + Nanopartículas de ouro (βA_{1-42} + GNPs) (20nm, 25µg/mL);
- Grupo 5- βA_{1-42} + UPBI + GNPs.

3.3 ADMINISTRAÇÃO βA_{1-42}

Os animais foram submetidos à injeção dos agregados βA_{1-42} ou ACSF que foram injetados no ventrículo lateral esquerdo a uma concentração de 400 pmol/µL, com volume de 4 µL unilateralmente no ventrículo. As micros injeções foram efetuadas utilizando uma seringa Hamilton de 10 µL acoplada a uma agulha de aço inoxidável de calibre 28, com 3 mm de

comprimento. A agulha foi inserida diretamente através da pele e do crânio no ventrículo lateral, orientada pela visualização de um triângulo equilátero entre os olhos e o centro do crânio para localizar o bregma (Laursen e Belknap, 1986; Gomes et al., 2013). Após o término da injeção, com duração de aproximadamente 30 segundos, a máscara de isoflurano foi retirada de forma que os animais acordem imediatamente. Os camundongos BalbC machos com 3 meses passaram pelo procedimento, onde foi administrado o peptídeo, e um dia após a realização do procedimento foram tratados por 17 dias com UPBI (1.0 MHz, 0.8 W/cm²) e GNPs (25µg/mL) via intranasal divididos conforme seus tratamentos.

3.4 TRATAMENTO

Para cada aplicação de UPBI e GNPs, os ratos foram anestesiados com isoflurano à 4% e mantidos anestesiados com a mesma solução. O tratamento foi realizado em dias intercalados (dia sim, dia não) por 17 dias e a primeira sessão de tratamento foi realizada 24h após a administração do peptídeo βA_{1-42} , conforme descrito na figura 2.

Foi utilizado um equipamento de UPBI (Empresa Imbramed, Brasil) para os tratamentos, com pulsos de 6 min de duração, frequência de 1.0 MHz, intensidade de 0,8 W/cm² e área de radiação efetiva (ERA) de 3 cm². Para cada camundongo, a área tratada com UPBI foi de aproximadamente 2 cm² localizando-se na região central do crânio. O tratamento foi aplicado através do movimento circular do cabeçote, com gel de salina 0,9% no grupo βA_{1-42} +UPBI e no grupo βA_{1-42} +UPBI+GNPs. O grupo βA_{1-42} +GNPs recebeu 25µg/mL de GNPs via intranasal (7 µl por narina) sem aplicação de UPBI. O grupo ACSF recebeu apenas ACSF. Todos os tratamentos foram realizados em dias intercalados, um dia sim e um dia não.

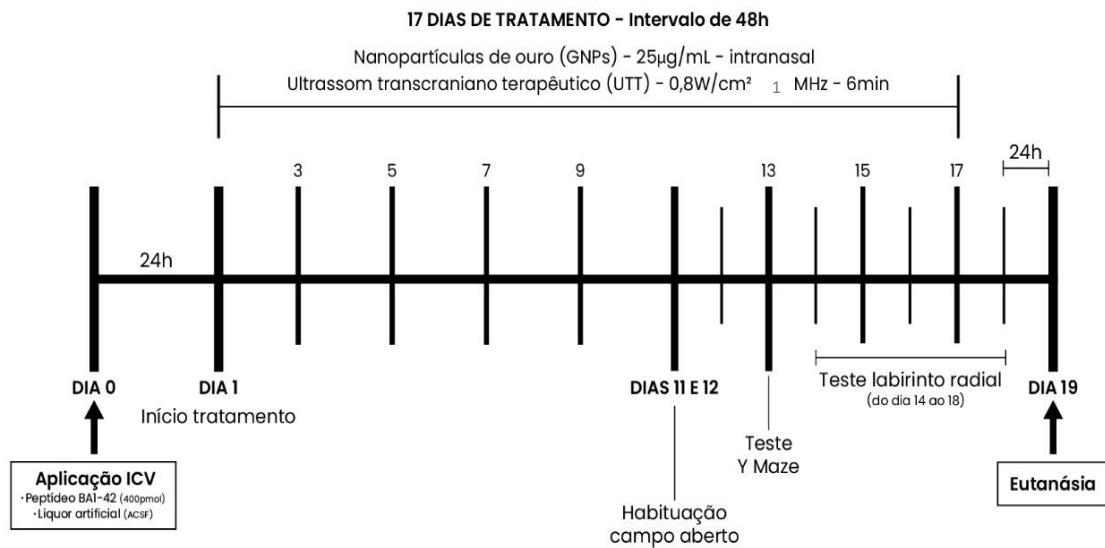


Figura 2 - Linha do tempo experimental. Fonte: elaborado pelo autor.

Todos os procedimentos foram realizados por pessoas treinadas em manusear camundongos BalbC e por técnicos do biotério da Unesc.

1

3.5 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

As GNPs foram obtidas pela redução de uma solução estoque de extrato *Curcuma longa* que foi preparada em Etanol absoluto. Soluções estoque de HAuCl_4 (4 mM), foram preparadas em água Milli Q. Na sequência, uma solução pré-definida de extrato foi adicionado em água Mili Q e mantida sob agitação e aquecimento até atingir a temperatura de 90°C . Hidróxido de sódio (NaOH) (0.1 M) foi usado para ajustar o pH entre 10 e 11. Na sequência, uma solução 1 mM de ácido cloroáurico (HAuCl_4) foi adicionada gota a gota sob agitação simultânea. A reação foi mantida sob agitação até atingir a temperatura ambiente e posterior formação das GNPs.

3.6 ULTRASSOM PULSADO DE BAIXA INTENSIDADE

O tratamento com UPBI iniciou 24 horas após a administração do peptídeo βA_{1-42} . Os animais foram previamente anestesiados em sistema de anestesia fechado, numa caixa acrílica de indução com um fluxo de 2,5 L/min de oxigênio com 4% de isoflórano. Após isso, foram

mantidos a 2% de isoflorano com inalação contínua, através de um equipamento específico da *Insight* (AI 100 - Anestesia Inalatória). A parte superior do crânio, entre as orelhas e logo após os olhos, foi o local de aplicação da terapia, e para que as ondas fossem penetradas no crânio utilizou-se gel condutor de Carbopol.

O equipamento indutor das ondas esteve contato direto com o gel e o crânio do rato, nos parâmetros: intensidade de $0,8 \text{ W/cm}^2$, frequência central de $1,0 \text{ MHz} \pm 10\%$, alteração por onda seno com ciclo de 50%, largura de pulso de 5 ms e frequência de repetições pulsadas 100 Hz e transdutor do dispositivo com as seguintes dimensões geométricas: Área aplicada ou face transdutor (diâmetro de abertura) = $44,0 \pm 0,3 \text{ mm}$; Tipo de feixe = Collimated; AIE (Área de Irradiação Eficaz) = $7,0 \text{ cm}^2$; BNR (Relação de Não-deformidade do Feixe) = 3 (Ibramed, 2012). A frequência da aplicação da terapia ocorreu a cada 24 horas, no mesmo horário, no tempo de 6 minutos por animal, durante 2 semanas. Os animais que não receberam terapia UPBI foram apenas anestesiados.

3.7 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.7.1 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi utilizado para investigar a atividade locomotora, a memória espacial de longo prazo e a memória de trabalho dos animais (Prut e Belzung, 2003; Gillfeldt, 2006). O aparelho feito de acrílico transparente com assoalho cinza foi dividido por linhas pretas em 25 quadrados ($10 \times 10 \text{ cm}$) e cercado por paredes elevadas em 40 cm de altura. Cada camundongo foi colocado no centro do campo aberto e o número total de cruzamentos registrado por 5 minutos. Um cruzamento foi registrado quando o animal atravessar um quadrante com as quatro patas. Grau de severidade leve.

3.7.2 Labirinto em Y (*Y-maze*)

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

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

3.7.3 Labirinto octogonal (*Radial Maze*)

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

3.8 EUTANÁSIA

Imediatamente após o último teste comportamental, os animais foram submetidos a eutanásia, por decapitação na guilhotina. Os animais ficaram aguardando a eutanásia na sala ao lado da sala de eutanásia para evitar que sentissem o cheiro do sangue. A guilhotina foi lavada em água corrente entre cada eutanásia. O córtex pré-frontal, hipocampo e fígado foram dissecados para posteriores análises bioquímicas e moleculares (n = 12), e, portanto,

armazenados em freezer -80 °C. Após a eutanásia os animais foram acondicionados em saco branco leitoso e encaminhados para freezer (conservação) na própria universidade.

3.9 HISTOLOGIA

As amostras teciduais do fígado foram embebidas em solução de paraformaldeído (PFA) a 10% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) por 24 horas. Posteriormente incluídas em parafina após desidratação e clareamento, e seccionadas em cortes de 5 µm de espessura. Através da coloração de hematoxilina-eosina (H&E) foi possível quantificar o infiltrado inflamatório. As lâminas foram lidas em microscópio óptico (Eclipse 50i, Nikon, Melville, NY, EUA), com aumento de 200x, e foram capturados quatro campos oculares por corte (5 animais / grupo). As imagens foram gravadas com o auxílio da câmera Nikon (Sight DS-5M-L1, Melville, NY, EUA) e analisadas no software NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA), considerando a coloração nuclear de células inflamatórias (H&E). Os dados foram expressos como densidade óptica (OD).

3.10 IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO

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

presença da HRP emite uma coloração azul específica. Para parar esta reação, utilizou-se 50 μ por poço de ácido sulfúrico diluído. A concentração das citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10) e fatores neurotróficos como (BDNF e NGF) foram determinadas via leitura da absorbância (450 nm) em espectrofotômetro (BIO-RAD, 680).

3.11 RT-PCR

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

3.12 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

3.12.1 Indicador da Formação de Óxido Nítrico (NO)

A produção de NO foi avaliada espectrofotometricamente através do metabólito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente Griess (1 % sulfanilamida e 0,1 % de N1 (naphthylethylenodiamina) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância foi medida a 540 nm. O conteúdo de nitritos foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabólito nitrito de sódio (NaNO₂). Os resultados foram calculados em μ mol Nitrito/mg proteína (Chae et al., 2004).

3.12.2 Níveis de Glutathione (GSH)

Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas adaptações. GSH foi mensurado no homogenato de tecido epitelial após precipitação de proteína com 1 mL proteína de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500 μ m DTNB. A absorbância foi lida a 412 nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutathiona reduzida foi usada para calcular os níveis de GSH nas amostras.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de memória de habituação ao campo aberto e Y-maze foram analisados por teste T de *Student* para amostras pareadas. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Os resultados do teste de labirinto octogonal foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via de medidas repetidas, seguido do teste de *post hoc* Tukey quando apropriado. Além disso, os dados de análises histológicas e bioquímicas foram expressos em média e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* Tukey. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de $P < 0,05$. Foi utilizado o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 17.0 como pacote estatístico.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS GNPS

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

Na Figura 3 encontram-se as imagens das nanopartículas obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. Como pode-se observar as GNPs apresentaram morfologia esférica e um tamanho médio de 25 nm.

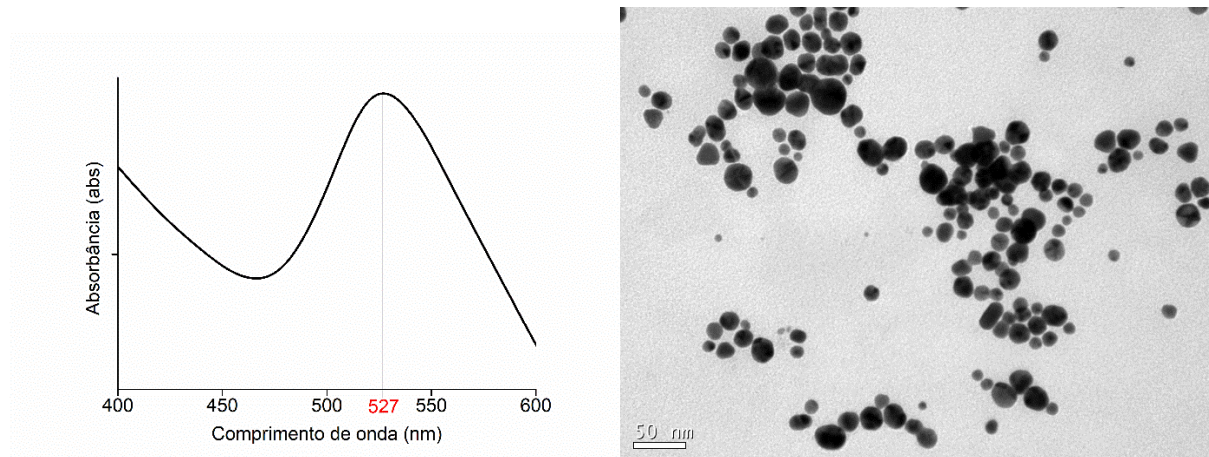


Figura 3 - (A) Análise de absorvância das GNPs sintetizadas com curcumina; em (B) a microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas com curcumina.

4.2 HISTOLOGIA

Na figura 4 é demonstrado as quantificações da média de número de infiltrado inflamatório no fígado. Não foi possível observar diferenças significativas no número de infiltrado inflamatório entre os grupos experimentais analisados ($p > 0.05$).

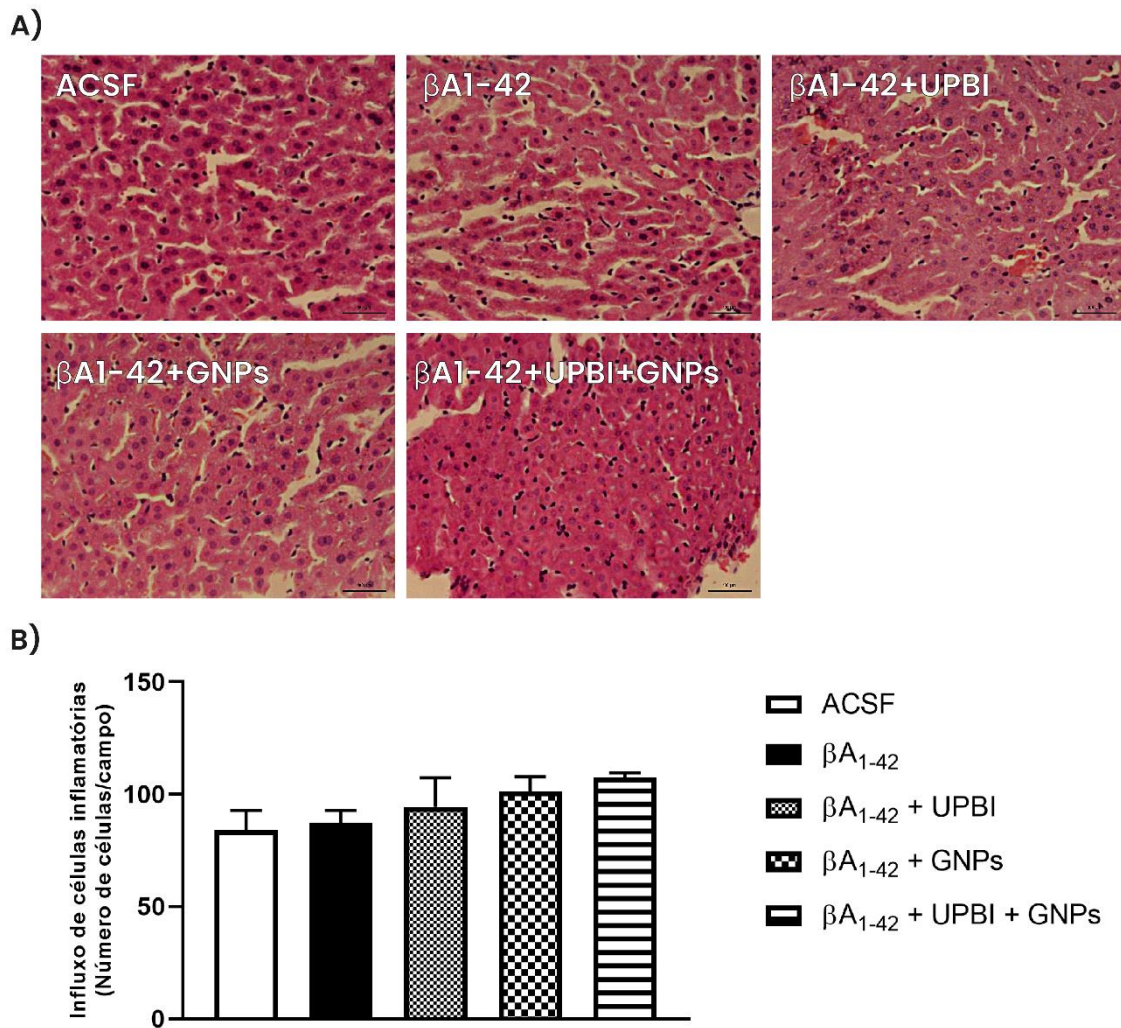


Figura 4 - Efeitos do tratamento com UPBI e/ou GNPs sobre a análise histológica com coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) no fígado (n-5 animais/grupo). Em A infiltrado inflamatório; em B número médio de infiltrado inflamatório. Os dados são expressos como média \pm SEM

4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

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

e explorar mais o novo braço sendo semelhante ao controle ($p < 0,05$), e não apresentando dano na memória espacial de curta duração.

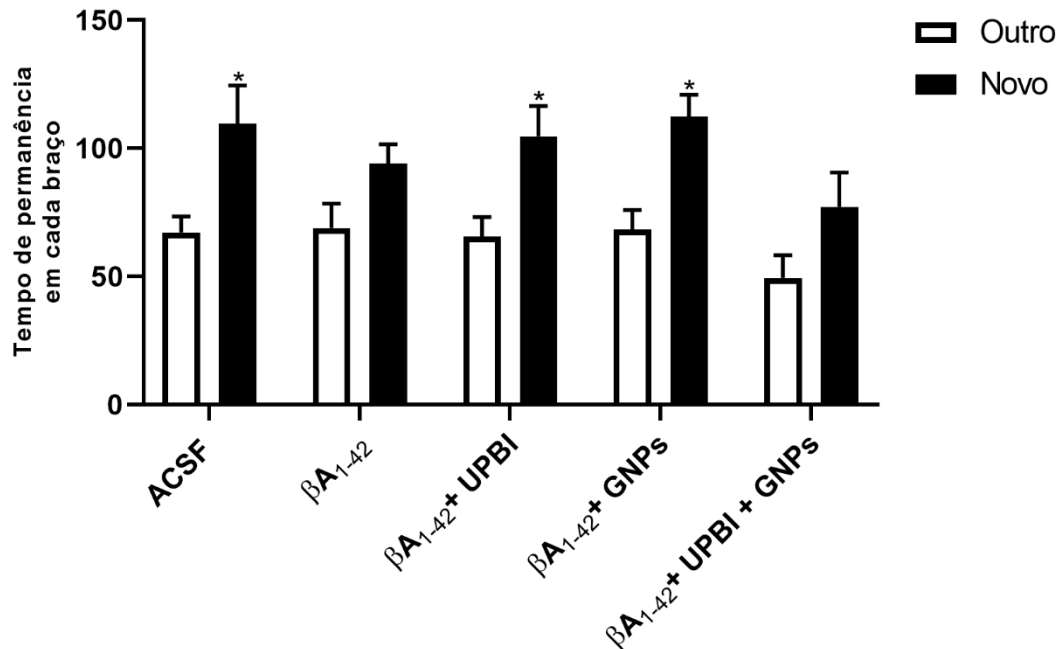


Figura 5 - Efeitos do tratamento com UPBI e GNPs sobre os dados do teste comportamental do Labirinto em Y em camundongos BalbC (n-12 animais/grupo). Os dados são expressos como média \pm SEM. (* $p < 0,05$) e quando comparado à sessão treino no mesmo grupo experimental. Seguido do teste T de Student para amostras pareadas.

A figura 6 mostra os dados referentes ao teste de labirinto radial nos camundongos BalbC. Estes resultados foram analisados durante quatro dias e comparados ao primeiro dia do teste dentro dos mesmos grupos experimentais. Em relação ao parâmetro de tempo total (figura 6), conforme elucidado abaixo, observa-se que o grupo ACSF aprendeu a tarefa no quarto dia de experimento, demonstrando que não houve dano na memória de longo prazo destes animais. No entanto, o grupo βA_{1-42} não demonstraram este mesmo aprendizado, indicando dano na memória espacial destes animais. Por outro lado, os grupos $\beta A_{1-42} + UPBI$ e $\beta A_{1-42} + GNPs$ não apresentaram dano, pois os animais aprenderam no terceiro e quarto dia. Já o grupo $\beta A_{1-42} + UPBI + GNPs$ demonstrou aprendizagem no quarto dia assim como grupo ACSF. Em relação ao parâmetro de erros totais (Figura 6B) observa-se que o grupo ACSF diminuiu a quantidade de erros para encontrar a recompensa no quarto dia de experimento, demonstrando que não houve dano na memória de longo prazo destes animais. No entanto, o grupo βA_{1-42} não demonstrou este mesmo aprendizado. Já os grupos $\beta A_{1-42} + UPBI$ e $\beta A + GNPs$ não

apresentaram dano, pois os animais aprenderam no terceiro e quarto dia. O grupo βA_{1-42} + UPBI + GNPs demonstrou aprendizagem no quarto dia assim como grupo ACSF.

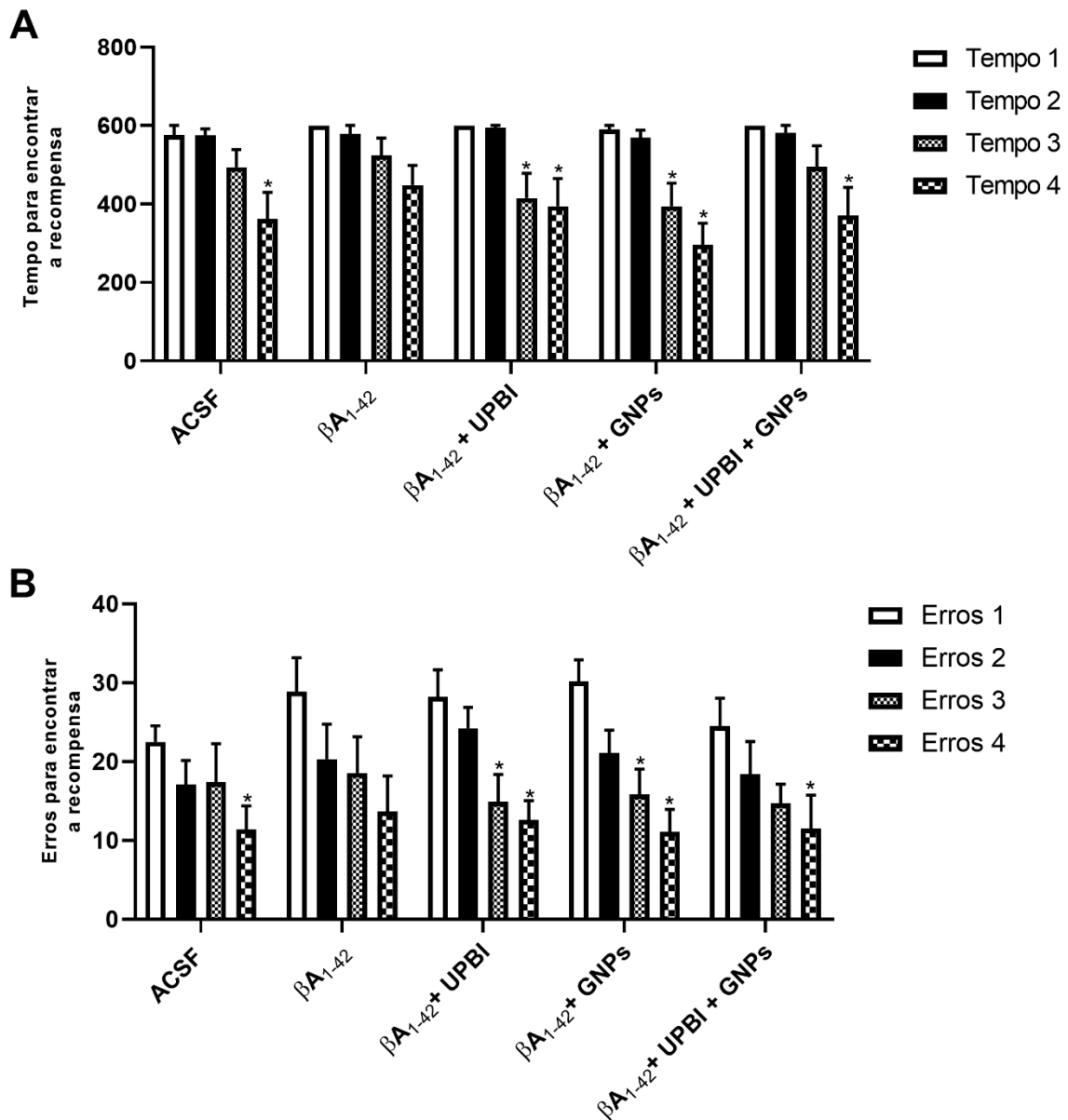


Figura 6 - Efeitos do tratamento com UPBI e GNPs sobre os dados do teste comportamental no labirinto radial em camundongos BalbC (n-12 animais/grupo). Os dados mostram o tempo (A) e o número de erros (B) para encontrar a recompensa. Os dados são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ quando comparado ao primeiro dia de experimento. (ANOVA de uma via de medidas repetidas, seguido do teste de post hoc Tukey).

A figura 7 mostra os dados do teste de campo aberto nos camundongos BalbC. Na figura A todos os grupos experimentais demonstraram diminuição do número de cruzamentos quando comparado o teste com o treino. Em B, todos os grupos experimentais exceto o grupo βA_{1-42} + UPBI tiveram uma diminuição do número de levantamentos quando comparado o teste com o treino.

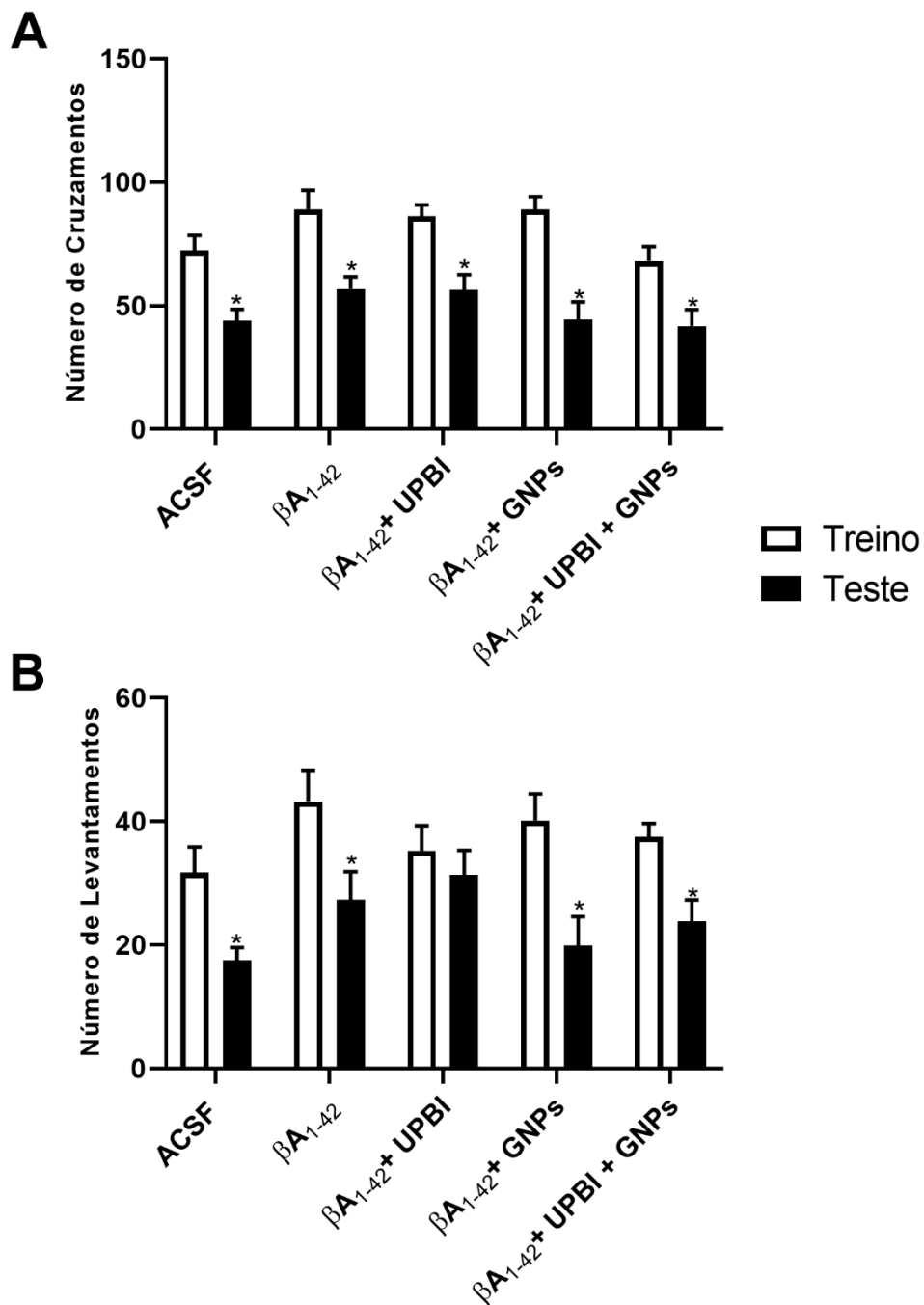


Figura 7 - Efeitos do tratamento com UPBI e GNPs sobre os dados do teste comportamental do Campo Aberto em camundongos BalbC (n-12 animais/grupo). Os dados mostram o número de cruzamentos em (A), e o número de levantamentos em (B). Os dados são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ quando comparado à sessão treino no mesmo grupo experimental. Seguidos do teste T de Student para amostras pareadas.

4.4 FATORES NEUROTRÓFICOS

Na figura 8 é possível observar os níveis de BDNF e NGF- β no córtex pré-frontal, o grupo βA_{1-42} demonstrou uma diminuição significativa nos níveis de BDNF quando comparados ao grupo ACSF. Já os grupos βA_{1-42} + UPBI, βA_{1-42} + GNPs ($p < 0,05$) e βA_{1-42} + UPBI + GNPs ($p < 0,01$) tiveram um aumento nos níveis de BDNF quando comparados ao grupo βA_{1-42} .

No hipocampo (figura 9), houve uma diminuição dos níveis de BDNF no grupo βA_{1-42} quando comparados ao grupo ACSF, observou-se que todos os grupos tratados apresentaram um aumento significativo comparado ao grupo βA_{1-42} ($p < 0,05$). Da mesma forma, os níveis de NGF- β foram reduzidos significativamente no córtex pré-frontal (figura 8B) e no hipocampo no grupo βA_{1-42} , em comparação com grupo ACSF (figura 9B).

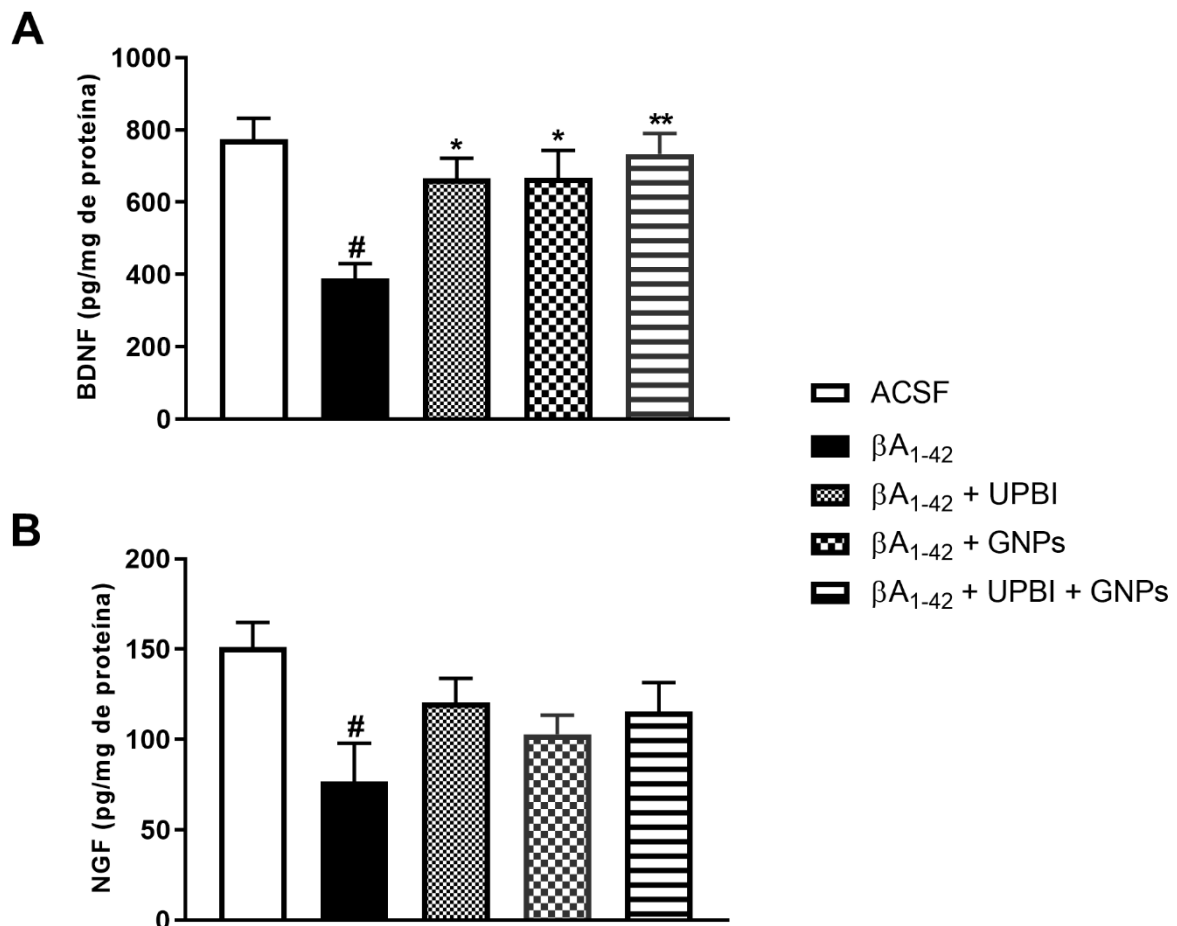


Figura 8 - Efeitos do tratamento com UPBI e GNPs sobre níveis de fatores neurotróficos no córtex avaliados 19 dias após indução de βA_{1-42} , (n-7 animais/grupo). Nos gráficos são apresentadas as avaliações de BDNF em A, NGF em B. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s βA_{1-42} ; ** $p < 0,01$ v.s βA_{1-42} ; # $p < 0,05$ v.s Grupo ACSF (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

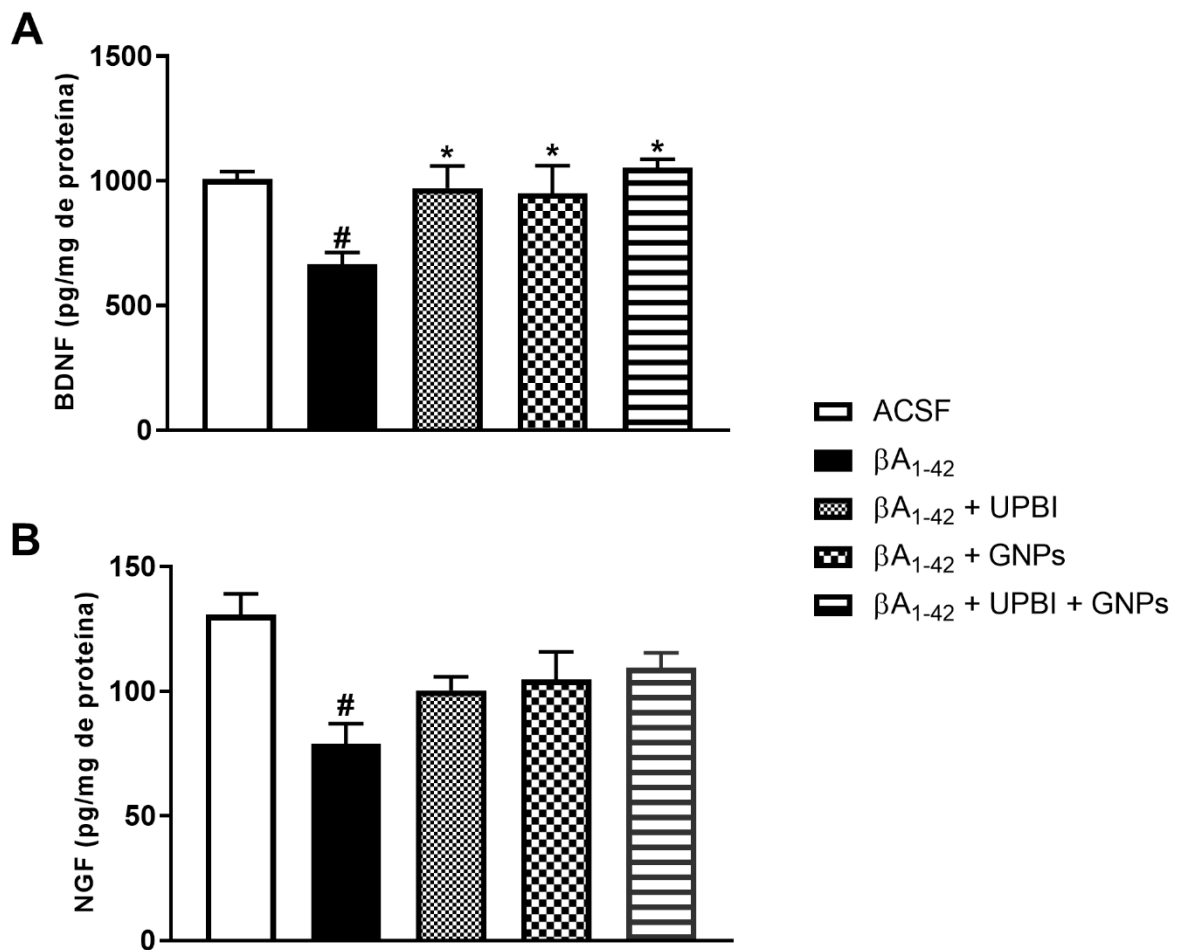


Figura 9 - Efeitos do tratamento com UPBI e GNPs sobre níveis de fatores neurotróficos no hipocampo avaliados 19 dias após indução de βA_{1-42} , (n=7 animais/grupo). Nos gráficos são apresentadas as avaliações de BDNF em A, NGF em B. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s βA_{1-42} ; # $p < 0,05$ v.s Grupo ACSF (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.5 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS

Na figura 10 e figura 11, são apresentados os níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. No córtex pré-frontal, na figura 10 A, não houve diferença significativa nos níveis de $TNF-\alpha$. Com relação aos níveis de $IL-1\beta$ na figura 10 B, o grupo βA_{1-42} apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo ACSF, e todos os grupos tratados foram capazes de reduzir significativamente os níveis de $IL-1\beta$ com relação ao grupo βA_{1-42} . Na análise dos níveis da citocina $IL-6$ na figura 10 C, houve um aumento significativo no grupo βA_{1-42} quando comparados ao grupo ACSF, todos os grupos tratados foram capazes de reduzir os níveis dessas citocinas quando comparados ao grupo βA_{1-42} .

Já na análise de hipocampo, observou-se que os níveis de TNF- α tiveram um aumento no grupo βA_{1-42} comparados com o grupo ACSF, todos os grupos tratados apresentaram uma redução significativa comparados ao grupo βA_{1-42} na figura 11 A. Da mesma maneira, nos níveis de IL-1 β figura 11 B houve um aumento significativo no grupo βA_{1-42} quando comparados ao grupo ACSF, e apenas o grupo terapia combinada foi capaz de reduzir os níveis de IL-1 β quando comparados ao grupo βA_{1-42} . Já nos níveis de IL-6 representados pela figura 11 C não houve diferença significativa nos níveis dessa citocina.

Quanto aos níveis proteicos de citocinas anti-inflamatórias, foi analisado na figura 10 e 11, os níveis de IL-10 no córtex pré-frontal e no hipocampo respectivamente. Igualmente (Figura 10 D e 11 D) os níveis de IL-10 foram reduzidos no grupo βA_{1-42} comparados ao grupo ACSF, apenas no hipocampo houve um aumento de IL-10 em todos os grupos tratados.

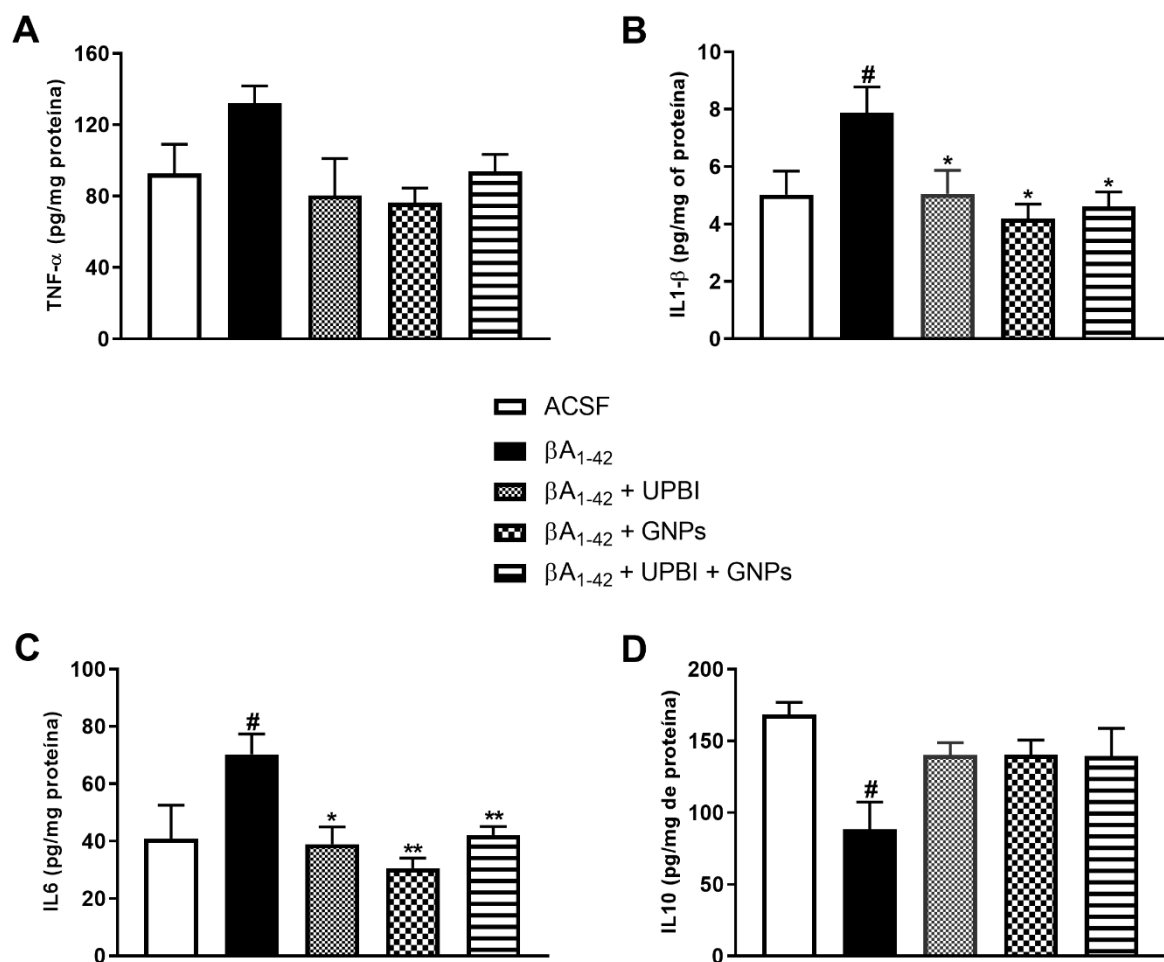


Figura 10 - Efeitos do tratamento com UPBI e GNPs sobre parâmetros de expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias do córtex avaliados 19 dias após indução de βA_{1-42} (n=7 animais/grupo).. Nos gráficos são apresentadas as avaliações de TNF- α em A, IL-1 β em B, IL-6 em C e IL-10 em D. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s βA_{1-42} ; ** $p < 0,01$ v.s βA_{1-42} ; # $p < 0,05$ v.s Grupo ACSF (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

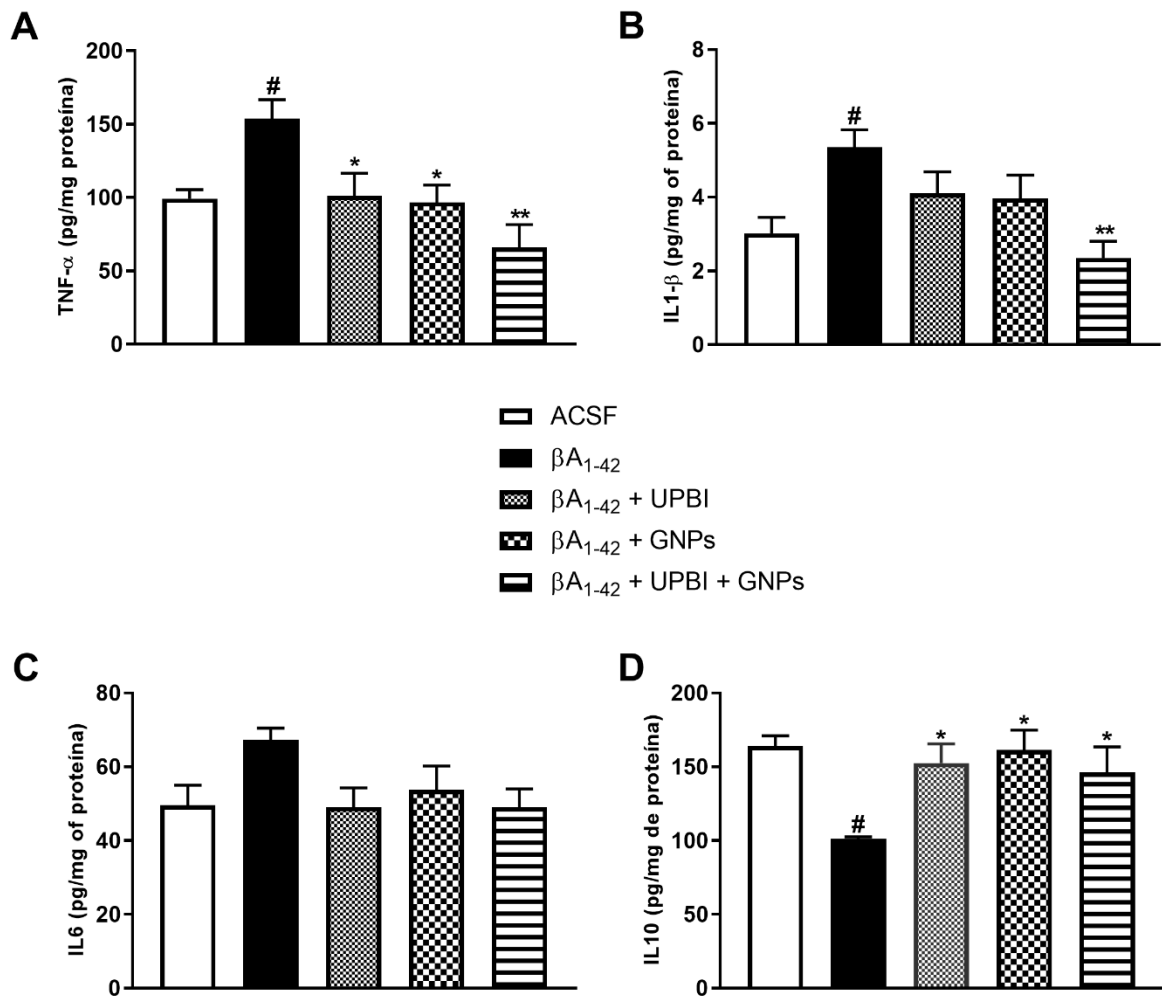


Figura 11 - Efeitos do tratamento com UPBI e GNPs sobre parâmetros de expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias do hipocampo avaliados 19 dias após indução de βA_{1-42} (n=7 animais/grupo). Nos gráficos são apresentadas as avaliações de TNF- α em A, IL-1 β em B, IL-6 em C e IL-10 em D. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s βA_{1-42} ; ** $p < 0,01$ v.s βA_{1-42} ; # $p < 0,05$ v.s Grupo ACSF (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.6 RT-PCR

Na figura 12 são mostrados os parâmetros de expressão gênica dos marcadores NF κ B e APP no hipocampo de camundongos BalbC. Em A, o grupo βA_{1-42} demonstrou um aumento significativo de NF κ B comparado ao grupo ACSF. Enquanto isso, todos os grupos tratados resultaram em uma diminuição significativa da expressão de NF κ B ao compará-los com o grupo βA_{1-42} . Em B, o grupo βA_{1-42} + UPBI apresentou diminuição significativa de APP em relação ao grupo βA_{1-42} .

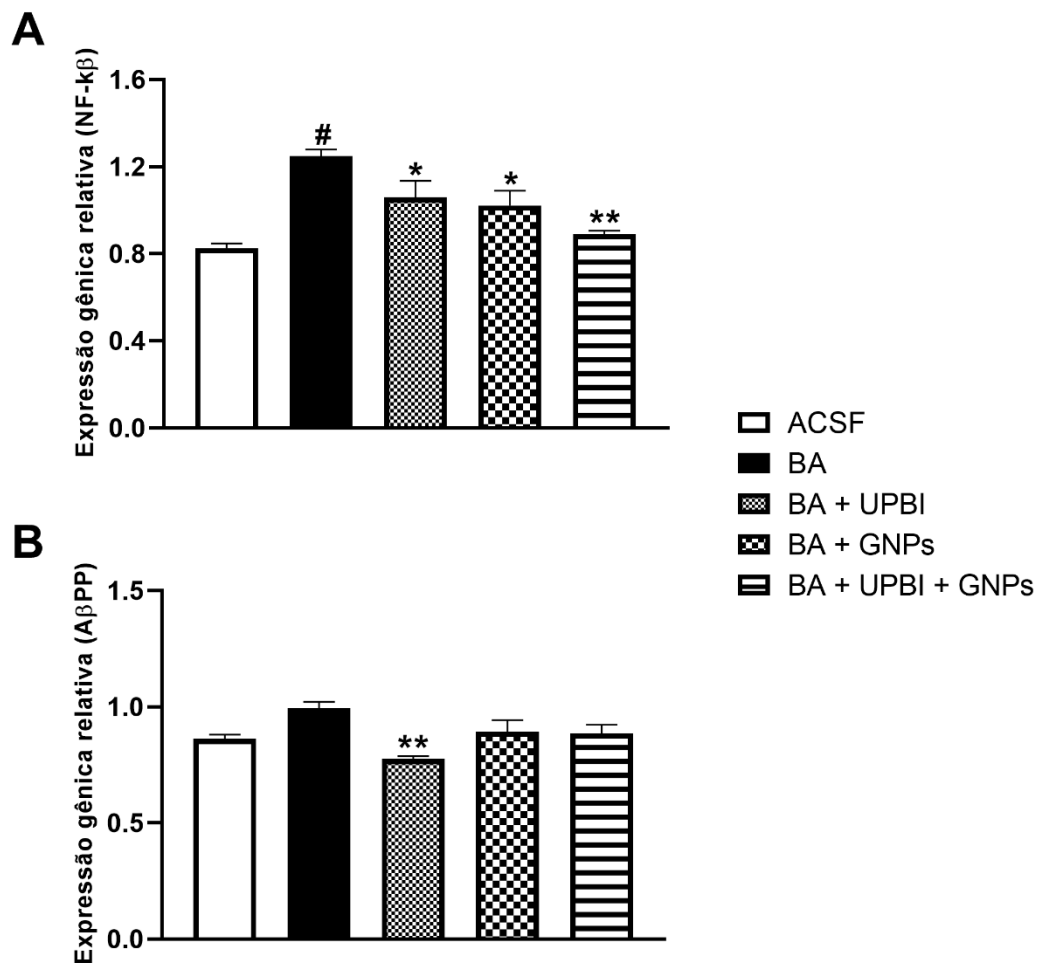


Figura 12 - Efeitos do tratamento com UPBI e GNPs sobre parâmetros de expressão gênica dos marcadores Nf-kβ e APP no hipocampo avaliados 19 dias após indução de βA_{1-42} (n-7 animais/grupo). Nos gráficos são apresentadas as avaliações de Nf-kβ em A e APP em B. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s βA_{1-42} ; ** $p < 0,01$ v.s βA_{1-42} ; # $p < 0,05$ v.s Grupo ACSF (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

4.7 MARCADOR DE ERN E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Como marcador secundário à produção óxido nítrico, os níveis de nitrito foram avaliados e demonstrados na figura 13 e 14. Tanto no córtex pré-frontal (13A), quanto no hipocampo (14A), houve um aumento dos níveis de nitrito do grupo βA_{1-42} quando comparados ao grupo ACSF, sendo que no hipocampo apenas o grupo $\beta A_{1-42} + UPBI + GNPs$ demonstrou uma redução desse marcador com relação ao grupo βA_{1-42} . No entanto, no córtex todos os grupos tratados foram capazes de reduzir significativamente os níveis de nitrito com relação ao grupo βA_{1-42} . Os níveis de GSH apresentaram redução significativa tanto no córtex (13B),

quanto no hipocampo (14B), no grupo βA_{1-42} comparados ao grupo ACSF, e todos os grupos tratados foram capazes de aumentar os níveis desse marcador antioxidante.

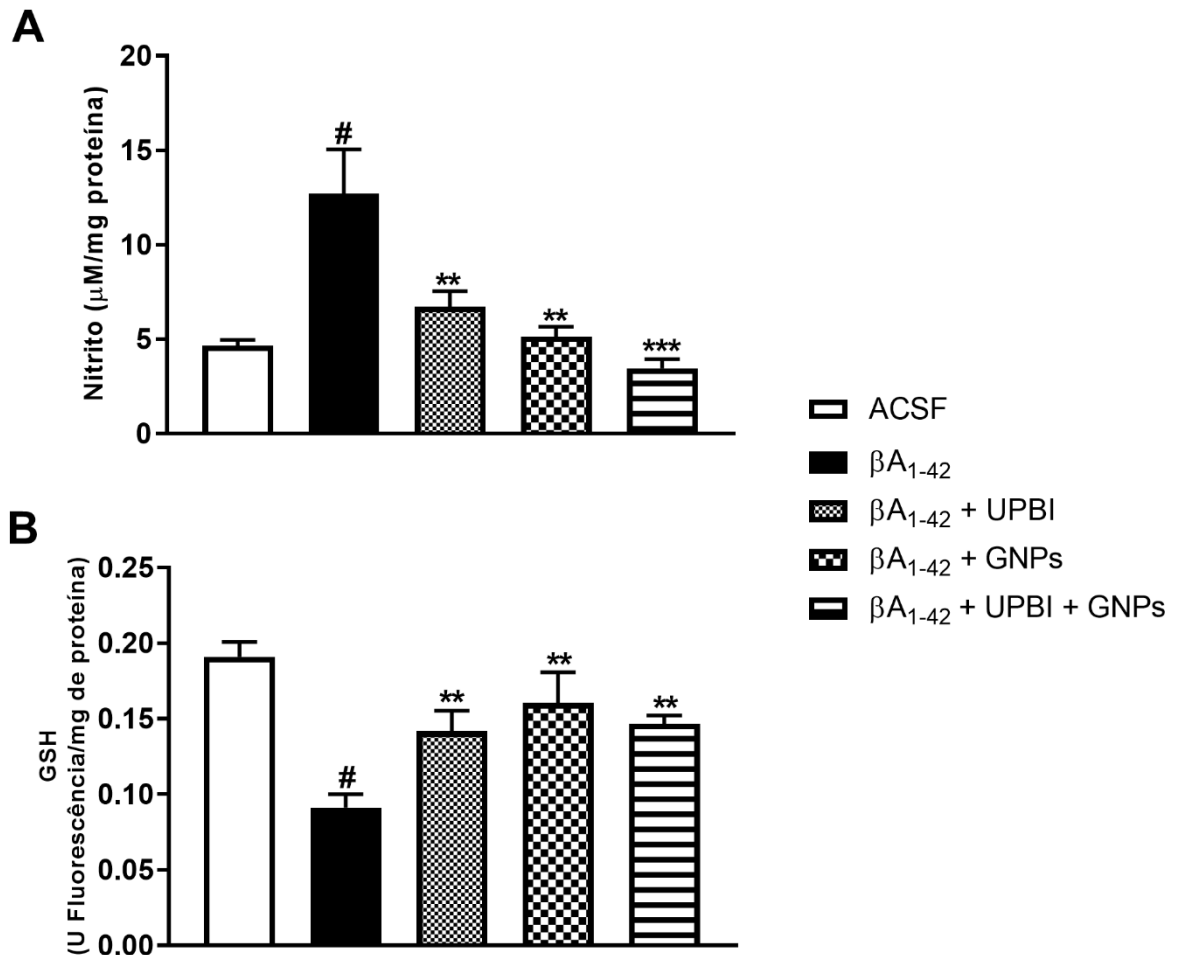


Figura 13 - Efeitos do tratamento com UPBI e GNPs sobre parâmetros oxidativos no córtex avaliados 19 dias após indução de βA_{1-42} (n-7 animais/grupo). Nos gráficos são apresentadas as avaliações de NO em A, e GSH em B. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s βA_{1-42} ; ** $p < 0,01$ v.s βA_{1-42} ; *** $p < 0,001$ v.s βA_{1-42} ; (DA) # $p < 0,05$ v.s Grupo ACSF (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

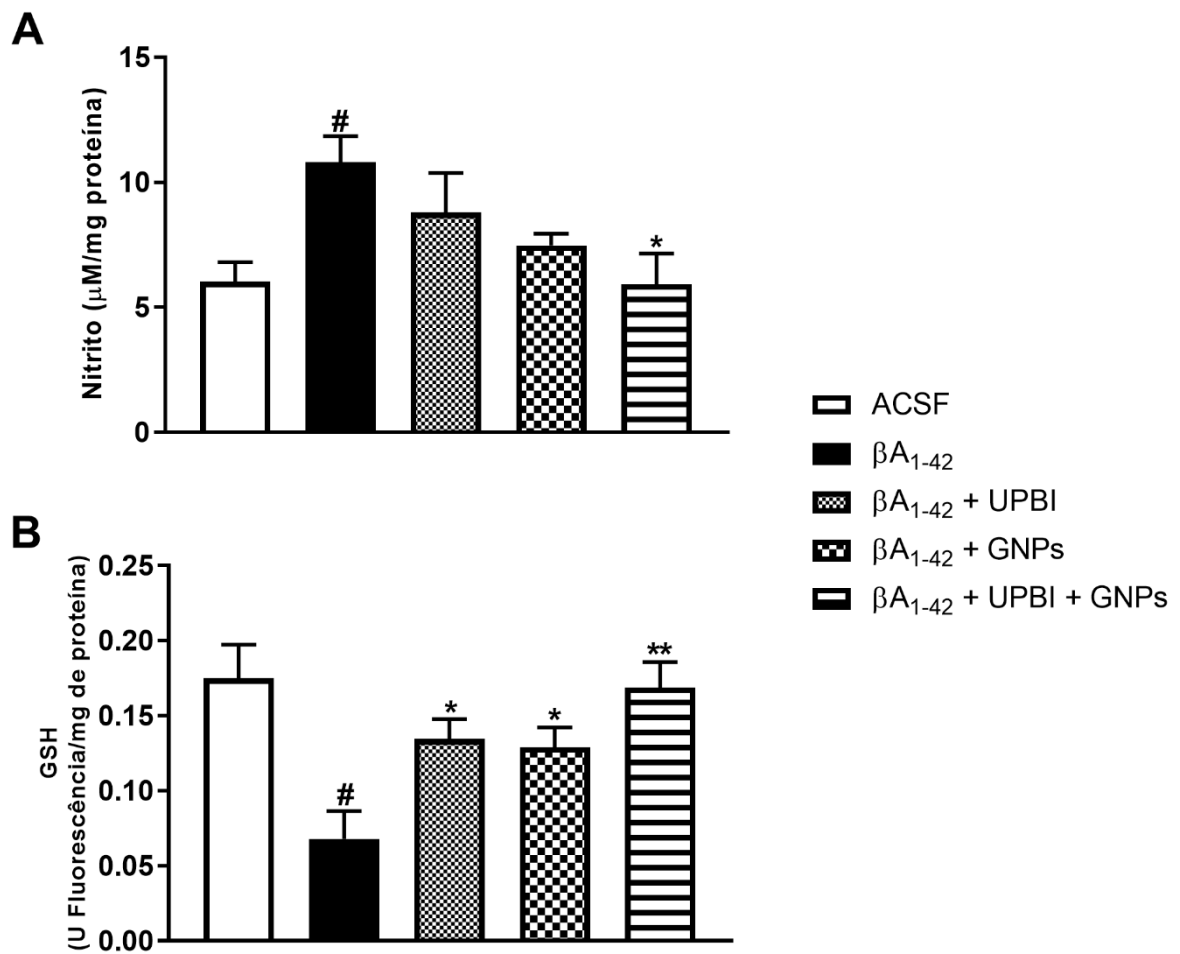


Figura 14 - Efeitos do tratamento com UPBI e GNPs sobre parâmetros oxidativos no hipocampo avaliados 19 dias após indução de βA_{1-42} (n=7 animais/grupo). Nos gráficos são apresentadas as avaliações de NO em A, e GSH em B. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s βA_{1-42} ; ** $p < 0,01$ v.s βA_{1-42} ; *** $p < 0,001$ v.s βA_{1-42} ; (DA) # $p < 0,05$ v.s Grupo ACSF (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey).

5 DISCUSSÃO

A complexidade da patogênese da DA tem sido um desafio persistente para o desenvolvimento de tratamentos, sendo essa patologia uma das doenças mais graves do século 21, responsável por 70% dos casos de demência no mundo (Zheng et al., 2023). Medicamentos ou métodos não invasivos existentes não são capazes de prevenir ou reverter os danos causados aos pacientes (Scheltens et al., 2016).

Na indústria farmacêutica existem diversos medicamentos que podem aliviar os sintomas da doença em seus estágios iniciais. Os mecanismos de ação desses medicamentos incluem inibidores das colinesterases e antagonistas dos receptores NMDA. No entanto, devido à progressão da patologia, tornam-se necessárias novas estratégias terapêuticas para o tratamento da DA, uma vez que os fármacos são capazes de atuar apenas nos sintomas da doença. Além disso, esses medicamentos vão diminuindo a sua eficácia no combate dos sintomas psíquicos ao longo do tempo (Briggs et al., 2016). Em decorrência disso, desenvolver terapias ou métodos confiáveis e eficazes contra a evolução da DA é um obstáculo (Garmendia et al., 2023). No presente estudo propõe-se uma nova abordagem de tratamento da DA, através do uso do UPBI e das GNPs, por se apresentarem como terapias indolores e com pouco desconforto ao paciente, além de serem métodos seguros e eficazes (Muller et al., 2017; Huang et al., 2019).

Segundo de la Torre (2004), o peptídeo β_{A1-42} , juntamente com os emaranhados de proteína tau e a exitotoxicidade glutamatérgica, são marcadores cerebrais essenciais na DA. O acúmulo das placas amilóides e NFTs, começam a se reunir livremente dentro do cérebro, acelerando sequencial e moderadamente o avanço da doença e eventualmente levando à disfunção neuronal, déficits cognitivos, destruição lenta e gradativa do hipocampo, córtex pré-frontal e morte celular. Para induzir o modelo de demência nos camundongos foi realizado a injeção ICV do peptídeo β_{A1-42} . A escolha dessa metodologia, assim como a dose, foi baseada em estudos anteriores, em que a injeção intracerebroventricular (ICV) do peptídeo induziu comprometimento da memória espacial e declínio da capacidade de aprendizagem (Budni et al., 2017; Garcez et al., 2019). As tarefas de memória associativa englobam a memória espacial, sendo um tipo de memória que requer o adequado funcionamento do hipocampo. Essa região do cérebro desempenha um papel crucial na orientação espacial e na navegação e é uma das áreas centrais mais impactadas pela DA (Lee et al., 2014).

Diante dos resultados encontrados, o presente estudo demonstrou um dano de memória espacial de curto prazo no grupo β_{A1-42} ao avaliar os camundongos no teste de Labirinto em Y,

visto que o dano de memória no grupo βA_{1-42} já é reconhecido em outros estudos com o peptídeo, causando neurotoxicidade e dano cognitivo nos animais (Budni et al., 2017; Garcez et al., 2018).

Os resultados indicam que o tratamento com UPBI e GNPs, de forma isolada, reverteram o comprometimento no processo de memória de aprendizagem. Estudos anteriores demonstraram que o uso do ultrassom terapêutico em modelos animais de DA apontaram melhorias significativas na cognição por meio do teste de reconhecimento de objeto (Shen et al., 2020; Tramontin et al., 2021). Em adição, o tratamento combinando ultrassom com anticorpos anti- βA demonstrou uma melhora significativa na memória espacial em camundongos, sendo aproximadamente 5 vezes maior do que aqueles animais que receberam apenas o anticorpo, após três dias de tratamento (Leinenga et al., 2021).

Tendo em vista que a diminuição da capacidade cognitiva e o declínio da memória espacial são sintomas clínicos da DA (Garcez et al., 2017), a administração do peptídeo também foi capaz de induzir danos de memória espacial de longo prazo, ao avaliar os camundongos no teste de labirinto radial. Nestes achados, o tratamento com UPBI e GNPs, de forma isolada e combinada, foram capazes de reverter o comprometimento no processo de memória de aprendizagem de longo prazo.

Corroborando com este estudo, o tratamento com UPBI foi capaz de aliviar o comprometimento cognitivo em camundongos transgênicos em um modelo de DA. Nessa mesma pesquisa, foi realizado o teste comportamental utilizando o labirinto aquático de Morris, onde os camundongos que foram expostos ao UPBI exibiram uma menor latência de escape para encontrar a plataforma (Shen et al., 2020). Além disso, autores postularam que o uso do ultrassom foi eficaz para melhorar a densidade das espinhas dendríticas nos neurônios corticais do hipocampo e córtex pré-frontal. As espinhas dendríticas estão fortemente relacionadas com a memória e no aprendizado (Penzes et al., 2011; Mufson et al., 2015).

Pesquisas anteriores destacam o efeito neuroprotetor das GNPs, principalmente nanopartículas obtidas a partir de síntese verde, através da melhora nas memórias espaciais e de reconhecimento, prevenindo déficits cognitivos e alterações motoras em um modelo animal de DA pós tratamento. Adicionalmente, sugere-se que a curcumina pode atuar como um antioxidante reduzindo o dano oxidativo, melhorando o estado de defesa antioxidante do cérebro e, assim, melhorando os déficits de aprendizagem e memória (Ishrat et al., 2009).

Quando foram avaliados os dados do teste de habituação ao campo aberto, o dano de memória espacial não foi observado, nem mesmo no grupo que teve a indução do modelo de demência. Fato que pode ser atribuído a exposição ao isoflurano, podendo ter influenciado na

deposição do peptídeo. No estudo de Vianna (2000), foi observado que a deposição do peptídeo βA_{1-42} foi menor a partir do uso do isoflurano, evidenciando um fator neuroprotetor no modelo empregado. Por outro lado, ao comparar aos resultados anteriores, o qual evidenciou dano de memória de curto e longo prazo, utilizando esse mesmo anestésico, acredita-se que ação do fármaco tenha sido diferente em regiões do cérebro que são responsáveis pelos diferentes tipos de memória (Quiroga et al., 2014).

Em contrapartida, as terapias propostas no presente estudo foram capazes de diminuir o número de cruzamentos e levantamentos dos camundongos submetidos ao campo aberto. Destacando o efeito neuroprotetor das GNPs e do UPBI, através de eficientes efeitos terapêuticos para modelos de DA e DP *in vivo* e *in vitro*, confirmando sua eficácia na reversão do comprometimento cognitivo e motor (Silveira et al., 2021; Silveira et al., 2023).

As pesquisas demonstraram que as GNPs e o UPBI podem ser terapias seguras e eficientes para tratar doenças neurodegenerativas, embora a maioria dos medicamentos e terapias atualmente disponíveis possuam efeitos colaterais (Muller et al., 2017; Yao et al., 2022; Casagrande et al., 2023). Fato que pode ser confirmado a partir da análise histológica do presente estudo, onde não foi observado aumento do número de infiltrado inflamatório em nenhuma das terapias analisadas no fígado dos camundongos.

As neurotrofinas, produzidas por células cerebrais são responsáveis por fazer a manutenção dos neurônios, bem como plasticidade neuronal. Fatores neurotróficos são polipeptídeos que podem promover a sobrevivência, crescimento e diferenciação de nervos e células (Yu et al., 2021). Dentre os fatores neurotróficos mencionados, destaca-se o BDNF e o NGF que são responsáveis por proteger sinapses contra vários insultos tóxicos em modelos animais de doenças neurodegenerativas, tais como DA, esclerose lateral amiotrófica (ELA) e DP (Lu et al., 2013).

Em adição, estudos indicam que uma redução dos níveis de BDNF no hipocampo é capaz de reduzir o número de sinapses, mas também causar défices na formação e consolidação da memória dependente do hipocampo (Sochal et al., 2022). Notavelmente, foi demonstrado que o BDNF protege e/ou repara neurônios e sinapses do hipocampo apesar do acúmulo de βA e da toxicidade neuronal através do aumento da ativação de TrkB, comprovando que a via de sinalização BDNF/TrkB pode ter um papel importante contra a patogênese da DA, sugerindo seu potencial terapêutico mesmo na presença de fatores patogênicos (Nagahara et al., 2009).

Conforme a literatura, os níveis de BDNF e NGF estão gravemente alterados nos cérebros de pacientes com DA. O BDNF é liberado por meio da ativação da microglia, sendo capaz de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ , enquanto

promove a expressão de citocinas anti-inflamatórias como; IL-4, IL-10, demonstrando que a liberação de BDNF pode modular a inflamação em vários níveis (Lu et al., 2013). Desta forma, os achados deste estudo demonstraram uma diminuição dessas neurotrofinas tanto no córtex pré-frontal quanto no hipocampo no grupo βA_{1-42} , como já esperado. No entanto, os grupos que receberam as terapias apresentaram um aumento significativo nos níveis de BDNF, em comparação ao grupo βA_{1-42} . Neste sentido, contribuindo com os achados deste trabalho, os estudos evidenciam que o tratamento com UPBI e GNPs podem manter ou até aumentar os níveis dessas neurotrofinas em um modelo animal de DA (Tyler et al., 2018; Zhang et al., 2022).

O tratamento com UPBI é capaz de estimular circuitos neurais no cérebro por meio da neuromodulação, aumentando a secreção de fatores neurotróficos. O UPBI estimula as redes cerebrais, podendo excitar, inibir ou interromper a dinâmica cerebral. A terapia altera as propriedades viscoelásticas das membranas celulares do SNC, modulando a excitabilidade neuronal. Além disso, o efeito mecânico da onda do ultrassom promove a deformação da membrana lipídica, induzindo uma abertura de canais iônicos por meio do mecanismo de cavitação, induzindo influxo de cálcio e aumento de impulsos nervosos e fatores neurotróficos (Chen et al., 2021).

Autores foram capazes de demonstrar que, em animais injetados com βA_{1-42} , os níveis de BDNF e NGF- β diminuíram tanto no córtex quanto no hipocampo. Ainda, os animais modelo de DA tratados com GNPs não apresentaram função cognitiva prejudicada, sugerindo que as GNPs modulam os efeitos da βA no cérebro promovendo um efeito neuroprotetor (Tramontin et al., 2020).

As GNPs possuem papel crucial na polarização de macrófagos. Essas moléculas são capazes de atravessar a BHE e promover a conversão da microglia do tipo M1 (pró-inflamatória) em microglia do tipo M2 (anti-inflamatória). Assim, reduz a neuroinflamação e a proliferação de astrócitos causada pela microglia do fenótipo M1. Também aumenta o efeito da microglia do fenótipo M2, regulando positivamente a expressão de IL-10, BDNF, NGF que estão intimamente relacionados com a regeneração neuronal e proteção cerebral (Ali et al., 2021; Li et al., 2022).

Até o momento, o acúmulo e a agregação do peptídeo βA , tem sido o modelo amplamente aceito para a compreensão da patogênese da DA. Essa teoria sugere que o depósito de proteína βA malformada desempenha um papel patológico crucial e inicial na DA, desencadeando a neuroinflamação, disfunção sináptica, perda de neurônios e o comprometimento cognitivo (Oliveira et al., 2021). O peptídeo βA , é formado pelo resultado do processamento da APP. Duas secretases, a γ -secretase e β -secretase, clivam a APP em

diferentes lugares originando fragmentos de β A de diferentes tamanhos, liberando fragmentos insolúveis, dentre eles, os mais importantes, para o processo fisiopatológico da DA, são o β A₁₋₄₂ e β A₁₋₄₀. Estes são capazes de se agregar e originar fibrilas e, por fim, a formação de placas senis. Ao formar essas placas, há uma indução do processo de neuroinflamação, levando a uma disfunção mitocondrial, resultando no excesso de EROs e, por fim, morte celular. (Ardura et al., 2017; Oliveira et al., 2021).

A neuroinflamação vem representando um fator crítico na fisiopatologia e progressão da DA na última década. O termo “neuroinflamação” indica a presença de uma resposta inflamatória no SNC, isso é capaz de gerar a ativação de células gliais, especificamente os astrócitos e a micróglia (Salminen et al., 2008). Assim, sob condições fisiológicas consideradas normais, a micróglia e os astrócitos desempenham um papel na vigilância imunológica. No entanto, essas células são ativadas em condições patológicas, como em doenças neurodegenerativas. Inicialmente, a micróglia tem um papel positivo na eliminação da β A por fagocitose. No entanto, após a exposição prolongada sua eficiência para eliminar a β A é reduzida, afetando negativamente a área cerebral, levando a um maior acúmulo de β A e consequentemente uma maior ativação da inflamação (Colonna et al., 2017; Zang et al., 2021).

Diante de um quadro de neuroinflamação prolongada, ocorre a deposição de peptídeo β A e acúmulo de células da glia. A partir dessa ativação, ocorre a produção de citocinas pró-inflamatórias, como (IL-1 β , IL-6, TNF- α), além do aumento de EROs, aumentando a neurotoxicidade (Shaw et al., 2007; de Oliveira et al., 2021). De acordo com Swardfager (2010), citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , mostram-se aumentadas em concentrações sanguíneas em pacientes com DA. Desta forma, este trabalho encontra-se alinhado com a literatura, uma vez que o grupo β A₁₋₄₂ apresenta níveis aumentados de citocinas como, IL-1 β , IL-6 no córtex pré-frontal. Já em hipocampo, níveis de IL-1 β e TNF- α também se encontram aumentados. O complexo hipocampal é a principal e uma das primeiras regiões afetadas durante a patologia da DA tendo sua conectividade alterada e apresentando-se como um parâmetro importante na DA pré-clínica (Harrison et al., 2016). Isso justifica a prevalência de citocinas como IL-1 e TNF- α neste estudo, que pode ser corroborada pela análise feita por Barrietos (2015), onde demonstrou que a maior resposta de IL-1 e TNF- α foi especificamente no hipocampo de ratos mais velhos, não sendo igualmente observada no hipotálamo, córtex parietal, córtex pré-frontal ou soro. Este fato pode ser atribuído pela alta expressão de receptores de IL-1 nos neurônios e na glia nas células granulares do giro denteado e na camada de células piramidais do hipocampo e pelo excesso de células da glia, como a micróglia nessa região (Barrietos et al., 2016).

Estas citocinas são ativadoras de uma infinidade de diferentes vias de sinalização que ativam outras citocinas e processos patológicos, tais como as expressão de quimiocinas, proteínas quinases, NFκB, proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), ciclo de divisão celular 2 quinase (cdc2) e JAK-STAT que estão intimamente envolvidas na progressão da DA. Adicionalmente, a ativação de células gliais e a liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias, como a superexpressão de TNF- α , desempenha um papel essencial na ativação do NFκB. Esse fator de transcrição está relacionado com o SNC em vários processos fisiológicos associados à transmissão de sinais, cognição e memória. Este aspecto se confirma através dos achados deste estudo, sobre a expressão gênica de NF- κB, que demonstrou aumento no grupo βA_{1-42} (Rather et al., 2021).

Por outro lado, a diminuição ou inibição desses marcadores, (IL1- β , TNF- α , IL-6, NFκB e APP) foi encontrada nos grupos tratados. Isso reafirma o papel anti-inflamatório das GNPs e do UPBI de forma isolada e principalmente no grupo com terapia combinada, no qual obteve valores mais significativos.

Concomitante à diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, observou-se aumento dos níveis de citocinas anti-inflamatórias nos grupos que receberam as terapias no hipocampo, como a IL-10. Entre os mecanismos existentes para evitar respostas neuroinflamatórias exacerbadas está a produção de citocinas anti-inflamatórias (Lobo et al., 2016). A micróglia é capaz de adquirir um fenótipo ativado, classicamente conhecido como M1. Esse fenótipo é caracterizado pela produção de mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas; espécies que reagem ao oxigênio e prostaglandinas. No outro extremo, na presença de IL-4 e IL-13, a micróglia diferencia-se em fenótipo M2, caracterizado pela expressão de IL-10. Esse fenótipo anti-inflamatório é reconhecido pelo seu papel neuroprotetor e tem sido implicado na resolução da inflamação, fagocitose e reparo tecidual (Fernandes et al., 2014; Nakagawa et al., 2015).

O UPBI já demonstrou uma capacidade de acelerar a fase aguda da inflamação e melhorar a recuperação de lesões musculares. A terapia com ultrassom é capaz de diminuir o infiltrado inflamatório no tecido muscular pós lesão. O estudo de Silva (2017), evidenciou uma redução do número de neutrófilos e macrófagos com fenótipo M1 após 1 dia de tratamento. Depois de dois dias, os músculos tratados com UPBI demonstraram uma transição do fenótipo de macrófago M1 para o fenótipo M2, intimamente relacionado com o reparo tecidual.

Além disso, o tratamento com UPBI foi capaz de promover a neuroproteção ao inibir a ativação da sinalização inflamatória TLR4 / NFκB induzida por uma neuroinflamação causada por LPS e ao aumentar a expressão associada de CREB / BDNF em camundongos tratados com

LPS. A ativação do NFκB mediada por TLR4 regula a expressão de vários mediadores pró-inflamatórios, principalmente citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Chen et al., 2019). Dessa maneira, este estudo demonstrou os efeitos protetores do UPBI contra a neurotoxicidade do βA_{1-42} , além de diminuir a expressão de βA_{1-42} e APP, e inibir a atividade da caspase 3. Fato que pode ter contribuído para as modulações dos marcadores pró-inflamatórios, como citocinas e expressão gênica de NFκB e APP nos grupos tratados com UPBI no presente estudo.

Adicionalmente, diversas intensidades do UPBI são capazes de reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias em culturas celulares de células cerebrais como a micróglia. Foi possível observar que o ultrassom inibiu as respostas inflamatórias por meio da troca de fenótipos de micróglia, mudando-as do fenótipo M1 para o M2, por meio de vias de sinalização, como STAT1/STAT6 e PPAR γ . O UPBI atenuou a fosforilação de STAT1 e promoveu a fosforilação de STAT6, indicando que o ultrassom é capaz de induzir uma mudança de fenótipo M1 para M2 mais rapidamente e consequentemente capaz de liberar mediadores benéficos através do fenótipo de micróglia M2, incluindo IL-10, CD206 e vários fatores neurotróficos como BDNF e NGF (Hsu et al., 2023). Outras abordagens para impulsionar a mudança de fenótipo de microglia para M2 incluem a administração de agentes anti-inflamatórios, cuja ação pode ser mediada pela IL-10, pois são conhecidos por aumentar a expressão dessa citocina (Lobo et al., 2016).

Isto posto, a literatura destaca as GNPs como molécula anti-inflamatória. Os autores descrevem os mecanismos de ação através da sua capacidade de bloquear a ativação do NF-κB, por meio da interação com o componente Cys-179, bloqueando a fosforilação da IκB quinase impedindo a translocação do NFκB para o núcleo (Mendes et al., 2020; Casagrande et al., 2023). A inibição da ativação do NFκB leva à regulação negativa da expressão de iNOS e COX-2, suprimindo a resposta inflamatória exacerbada (Khan et al., 2018). Além disso, as GNPs têm sido relatadas por interagir fisicamente com quimiocinas e citocinas, como por exemplo, a IL-1 β , neutralizando assim a ligação de IL-1 β ao seu receptor de membrana inibindo a cascata de sinalização pró-inflamatória, efeito esse já demonstrado em trabalhos anteriores do grupo (Haupenthal et al., 2020; Zaccaron et al., 2022).

As GNPs são capazes de promover uma redução significativa na interação de leucócitos com endotélio, essas moléculas entram no tecido cerebral através da BHE e reduzem a concentração de TNF- α no cérebro, mediando indiretamente a redução da fosforilação de IκB α e inibindo a expressão ou atividade de NFκB. Com isso, os leucócitos polimorfonucleares circulantes nos tecidos são reduzidos, a expressão de ICAM-1 nas células endoteliais é reduzida, suprimindo assim a adesão firme dos neutrófilos à superfície endotelial. Isto promove

uma diminuição na resposta neuroinflamatória e tem implicações positivas no tratamento da DA (Aili et al., 2023).

Ainda mediante suas características anti-inflamatórias, as GNPs com pequenos diâmetros podem cruzar facilmente a BHE, devido ao aumento da área de superfície de interação com as GNPs. Mesmo que uma parte seja perdida, um grande número de GNPs podem cruzar a BHE. Essa entrega de GNPs através da BHE pode ser facilitada por meio da aplicação do UPBI, o mecanismo de cavitação gera ondas mecânicas que podem causar uma abertura rápida e transitória na BHE, o que facilita a administração de fármacos e nanopartículas contribuindo para o tratamento de doenças como a DA e reduzindo a neuroinflamação (Géraudie et al., 2023).

Por outro lado, a resposta inflamatória também está envolvida na produção de EROs. A neuroinflamação é acompanhada por extensa fagocitose, aumento do consumo de oxigênio e disfunção mitocondrial, o que favorece a formação de EROs e possibilita um quadro de estresse oxidativo (Markesbery, 1997). Tudo isso em conjunto, pode ser o gatilho para a exacerbação do processo inflamatório, como a produção de citocinas que são nocivas para o cérebro, ou mesmo ocasionando indução e aumento de EROS através da inflamação. O aumento das EROs ou de ERNs no cérebro está fortemente associado a modelos de demência e/ou DA (Arimon et al., 2015). Todos os grupos tratados com GNPs e UPBI foram capazes de reduzir o marcador de oxidante, como o nitrito, tanto no córtex pré-frontal quanto no hipocampo quando comparados ao grupo β A. Além disso, as terapias foram capazes de aumentar os níveis de GSH, principalmente na terapia combinada.

O UPBI já demonstrou seus efeitos antioxidantes em um modelo de lesão muscular, diminuindo algumas espécies reativas como DCF e Nitrito, e aumentando enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD) e GSH (Zortéa et al., 2015). Recentemente, um estudo em um modelo de DA utilizou as GNPs estabilizadas com GSH em células-tronco neurais humanas GIBCO® (hNSC) e, como resultado, obteve a normalização do influxo de cálcio e dos níveis de citocromo c liberados da mitocôndria para o citosol. Além disso, as GSH-GNPs melhoraram os níveis de ASK1 que é uma das várias proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP3Ks) e que são ativadas em resposta a estímulos pró-inflamatórios, EROs e outros estresses celulares (Chiang et., 2022).

Pesquisas já propuseram que as GNPs possuem alta tendência para aceitar elétrons e interagir com EROs para desativá-los ou eliminá-los, através do efeito *scavenger* (Gao et al., 2017). Um estudo de mostrou que culturas de macrófagos estimuladas com LPS e tratadas com GNPs, apresentaram inibição da produção de óxido nítrico e supressão da via NF κ B com

diminuição nos níveis de AKT. Além disso, as GNPs podem afetar as ligações tiol de Keap1, causando uma mudança conformacional que permite a liberação de NRF2 (fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide) para posterior transcrição de genes citoprotetores, contribuindo assim para a homeostase celular (Mendes et al., 2022).

Tais aspectos comportamentais e bioquímicos podem ser apoiados por meio dos resultados apresentados. Isso devido aos efeitos neuroprotetores das terapias através de uma melhora no comprometimento cognitivo, redução de citocinas pró-inflamatórias, aumento de fatores neurotróficos, níveis de antioxidantes e diminuição de EROs. Com isso, mesmo as terapias isoladas apresentando uma melhor efetividade nos testes comportamentais, o grupo associado demonstrou uma tendência de aumento do potencial terapêutico e neuroprotetor quando analisados os parâmetros de comportamento e análises bioquímicas de uma forma geral. Corroborando, por meio de parâmetros investigados, com os melhores resultados evidenciados no grupo $\beta A_{1-42} + GNPs + UPBI$.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que as terapias propostas como o UPBI e as GNPs de forma isolada e combinada tiveram efeitos neuroprotetores em um modelo de Doença de Alzheimer induzida por βA_{1-42} ICV.

As terapias conseguiram modular positivamente o comprometimento cognitivo nos animais, diminuindo citocinas pró-inflamatórias, aumentando os níveis de fatores neurotróficos, citocinas anti-inflamatórias e modulando conseqüentemente o estado redox. Por outro lado, as terapias isoladas demonstraram uma melhor efetividade nos testes comportamentais, porém, o grupo terapia combinada demonstrou maior potencial terapêutico porque conseguiu modular um número maior de parâmetros comportamentais, moleculares e bioquímicos, apontando resultados mais significativos.

Entretanto, pesquisas básicas adicionais com outros modelos animais e com outras análises moleculares e bioquímicas são necessárias para demonstrar toda maquinaria celular envolvida na aplicação dessas terapias e sua segurança na aplicação transcraniana. Atualmente, o desafio é encontrar a padronização do tempo e da intensidade da aplicação do UPBI em doenças neurodegenerativas, fator limitante no presente estudo, e isso pode ter contribuído para que o grupo de terapia combinada não demonstrasse resultados significativos em alguns parâmetros analisados.

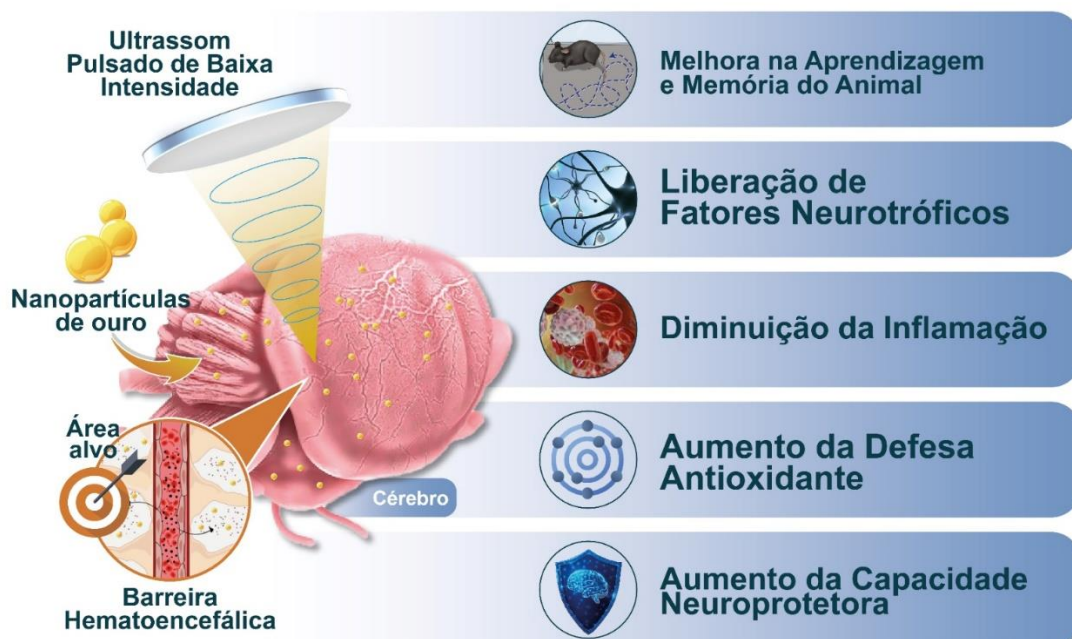


Figura 15 - Síntese dos principais achados sobre as terapias com UPBI e GNPs no tratamento para a DA. Fonte: elaborado pelo próprio autor.

REFERÊNCIAS

- Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-126.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole G M, Wyss–Coray T. Inflammation and Alzheimer’s disease. *Neurobiol. Aging.* 2000; 21(3):383-421.
- Ali HR, Selim SA, Aili D. Effects of macrophage polarization on gold nanoparticle-assisted plasmonic photothermal therapy. *RSC Adv.* 2021; 19;11(40):25047-25056.
- Ardura-Fabregat A, Boddeke EWGM, Boza-Serrano A, Brioschi S, Castro-Gomez S, Ceyzériat K, Dansokho C, Dierkes T, Gelders G, Heneka MT, Hoeijmakers L, Hoffmann A, Iaccarino L, Jahnert S, Kuhbandner K, Landreth G, Lonnemann N, Löschmann PA, McManus RM, Paulus A, Reemst K, Sanchez-Caro JM, Tiberi A, Van der Perren A, Vautheny A, Venegas C, Webers A, Weydt P, Wijasa TS, Xiang X, Yang Y. Targeting Neuroinflammation to Treat Alzheimer's Disease. *CNS Drugs.* 2017;31(12):1057-1082.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 2006; 32:279-312.
- Beal M. F. Oxidative damage as an early marker of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol. Aging.* 2005; 26(5): 585-586.
- Bettens K, Slegers K, Van Broeckhoven C. Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Hum. Mol. Genet.* 2010; 19(R1):R4-R11.
- Brejyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules.* 2020; 25 (24).
- Briggs R, Kennelly SP, O'Neill D. Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clin Med (Lond).* 2016;16(3):247-53.
- Budni J, Feijó DP, Batista-Silva H, Garcez ML, Mina F, Belletini-Santos T, Krasilchik LR, Luz AP, Schiavo GL, Quevedo J. Lithium and memantine improve spatial memory impairment and neuroinflammation induced by β -amyloid 1-42 oligomers in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2017; 141:84-92.
- Calsolaro V, Edison P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current evidence and future directions. *Alzheimers. Dement.* 2016; 12(6):719-732.
- Chen CH, Zhou W, Liu S, Deng Y, Cai F, Tone M. Increased NF-kappaB signalling up-regulates BACE1 expression and its therapeutic potential in Alzheimer's disease. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2012; 15: 77– 90.
- Chen Y, Li Y, Du M, Yu J, Gao F, Yuan Z, Chen Z. Ultrasound neuromodulation: Integrating medicine and engineering for neurological disease treatment. *BIO Integration.* 2021; 2(4), 169-179.

- Chen Y, Li Y, Du M, Yu J, Gao F, Yuan Z, Chen Z. Ultrasound Neuromodulation: Integrating Medicine and Engineering for Neurological Disease Treatment. *BIO Integration*. 2021; 2(4):169-179.
- Chen Z, Zhong C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci. Bull.* 2014; 30: 271–281.
- Cho JW, Lee KS, Kim CW. Curcumin attenuates the expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha as well as cyclin E in TNF-alpha-treated HaCaT cells; NF-kappaB and MAPKs as potential upstream targets. *Int J Mol Med.* 2007; 19(3):469-74.
- Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol.* 2017; 26;35:441-468.
- da Rocha F R, Haupenthal D P D S, Zaccaron R P, Corrêa M E A B, Tramontin N D S, Fonseca J P, Silveira P C L. Therapeutic effects of iontophoresis with gold nanoparticles in the repair of traumatic muscle injury. *J Drug Target.* 2020; 28(3):307-319.
- de Bem Silveira G, Muller A P, Machado-de-Ávila R A, Silveira P C L. Advance in the use of gold nanoparticles in the treatment of neurodegenerative diseases: new perspectives. *Neural Regen. Res.* 2021; 16(12): 2425.
- de la Torre JC. Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics. *Lancet Neurol.* 2004;3(3):184-90.
- de Oliveira J, Kucharska E, Garcez ML, Rodrigues MS, Quevedo J, Moreno-Gonzalez I, Budni J. Inflammatory Cascade in Alzheimer's Disease Pathogenesis: A Review of Experimental Findings. *Cells.* 2021; 28;10(10):2581.
- Doroszkiwicz J, Mroczko P, Kulczyńska-Przybik A. Inflammation in the CNS: Understanding Various Aspects of the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res.* 2022;19(1):16-31.
- Dos Santos Tramontin N, da Silva S, Arruda R, Ugioni KS, Canteiro PB, de Bem Silveira G, Mendes C, Silveira PCL, Muller AP. Gold Nanoparticles Treatment Reverses Brain Damage in Alzheimer's Disease Model. *Mol Neurobiol.* 2020;57(2):926-936.
- dos Santos Tramontin N, Silveira P C L, Tietbohl L T W, Pereira B D C, Simon K, Muller A P. Effects of Low-Intensity Transcranial Pulsed Ultrasound Treatment in a Model of Alzheimer's Disease. *Ultrasound Med Biol.* 2021; 47(9): 2646-2656.
- Filho M C B, dos Santos Haupenthal D P, Zaccaron R P, de Bem Silveira G, de Roch Casagrande L, Lupselo F S, Silveira P C L. Intra-articular treatment with hyaluronic acid associated with gold nanoparticles in a mechanical osteoarthritis model in Wistar rats. *Journal of Orthopaedic Research®.* 2021; 39(12):2546-2555.
- Flohé L, Gunzler W. Assay of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology.* 1984; 105: 114-21.

Gao G, Zhang M, Gong D, Chen R, Hu X, Sun T. The size-effect of gold nanoparticles and nanoclusters in the inhibition of amyloid- β fibrillation. *Nanoscale*. 2017; 9(12): 4107-4113.

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

Garcez ML, Mina F, Bellettini-Santos T, da Luz AP, Schiavo GL, Macieski JMC, Medeiros EB, Marques AO, Magnus NQ, Budni J. The Involvement of NLRP3 on the Effects of Minocycline in an AD-Like Pathology Induced by β -Amyloid Oligomers Administered to Mice. *Mol Neurobiol*. 2019;56(4):2606-2617.

Garmendia JV, De Sanctis CV, Das V, Annadurai N, Hajduch M, De Sanctis JB. Inflammation, Autoimmunity and Neurodegenerative Diseases, Therapeutics and Beyond. *Curr Neuropharmacol*. 2023;17.

Géraudie A, Riche M, Lestra T, Trotier A, Dupuis L, Mathon B, Carpentier A, Delatour B. Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound-Induced Blood-Brain Barrier Opening in P301S Mice Modeling Alzheimer's Disease Tauopathies. *Int J Mol Sci*. 2023 Aug 3;24(15):12411.

Guo JT, Yu J, Grass D, deBeer FC, Kindy MS. Inflammation-dependent cerebral deposition of serum amyloid a protein in a mouse model of amyloidosis. *J Neurosci*. 2002; 22: 5900–5909.

Hou K, Zhao J, Wang H, Li B, Li K, Shi X, Tang Z. Chiral gold nanoparticles enantioselectively rescue memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Commun*. 2020; 11(1):1-11.

Huang X, Lin Z, Wang K, Liu X, Zhou W, Meng L, Huang J, Yuan K, Niu L, Zheng H. Transcranial Low-Intensity Pulsed Ultrasound Modulates Structural and Functional

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Brasil, 2018. Número de idosos cresce 18% em 05 anos e ultrapassa 30 milhões em 2017. Agência IBGE notícias, 2018.

Ishrat T, Hoda MN, Khan MB, Yousuf S, Ahmad M, Khan MM, Ahmad A, Islam F. Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). *Eur Neuropsychopharmacol*. 2009;19(9):636-47.

Ishrat T, Hoda MN, Khan MB, Yousuf S, Ahmad M, Khan MM, Ahmad A, Islam F. Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). *Eur Neuropsychopharmacol*. 2009 Sep;19(9):636-47.

J. *Alzheimer's Dis*. 2013; 57(4):1105-1121.

Juszczak G, Mikulska J, Kasperek K, Pietrzak D, Mrozek W, Herbet M. Chronic stress and oxidative stress as common factors of the pathogenesis of depression and Alzheimer's disease: The role of antioxidants in prevention and treatment. *Antioxidants*. 2021; 10(9):1439.

- Kamat P K, Kalani A, Rai S, Swarnkar S, Tota S, Nath C, Tyagi N. Mechanism of oxidative stress and synapse dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: understanding the therapeutics strategies. *Mol. Neurobiol.* 2016; 53(1):648-661.
- Kamat PK, Rai S, Swarnkar S, Shukla R, Ali S, Najmi AK, Nath C. Okadaic acid-induced tau phosphorylation in rat brain: role of NMDA receptor. *Neuroscience.* 2013; 238: 97-113.
- Karthikeyan A, Senthil N, Min T. Nanocurcumin: A Promising Candidate for Therapeutic Applications. *Front Pharmacol.* 2020;11:487.
- Khan A, Jahan S, Imtiyaz Z, Alshahrani S, Antar Makeen H, Mohammed Alshehri B, Rehman M U. Neuroprotection: Targeting multiple pathways by naturally occurring phytochemicals. *Biomedicines.* 2020; 8(8): 284.
- Khosravi F, Hojati V, Mirzaei S, Hashemi M, Entezari M. Curcumin neuroprotective effects in Parkinson disease during pregnancy. *Brain Res Bull.* 2023; 201:110726.
- Khosropanah MH, Dinarvand A, Nezhadhosseini A, Haghghi A, Hashemi S, Nirouza F, Khatamsaz S, Entezari M, Hashemi M, Dehghani H. Analysis of the Antiproliferative Effects of Curcumin and Nanocurcumin in MDA-MB231 as a Breast Cancer Cell Line. *Iran J Pharm Res.* 2016;15(1):231-9.
- Kwon H S, Koh S H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl. Neurodegener.* 2020; 9(1): 1-12.
- Lee JY, Sooyeon K, Yoo HB, Park S, Choi JS, Kwon JS, Cha KR, Jung HY. Spatial memory impairments in amnesic mild cognitive impairment in a virtual radial arm maze. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2014; 653-660.
- Leinenga G, Koh WK, Götz J. A comparative study of the effects of Aducanumab and scanning ultrasound on amyloid plaques and behavior in the APP23 mouse model of Alzheimer disease. *Alzheimers Res Ther.* 2021; 9;13(1):76.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 464-478.
- Li N, Du Q, Jing Z, Xue L, He W, Zhang X, Sun Z. Study of the effects of Au@ZIF-8 on metabolism in mouse RAW 264.7 macrophages. *Biomater Adv.* 2022 Jul;138:212800.
- Lin W T, Chen R C, Lu W W, Liu S H, Yang F Y. Protective effects of low-intensity pulsed ultrasound on aluminum-induced cerebral damage in Alzheimer's disease rat model. *Sci. Rep.* 2015; 5(1): 1-7.
- Liu D, Liu J, Sun D, Alcock NW, Wen J. Spinal cord injury increases iron levels: catalytic production of hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med.* 2003;3:64-71.
- Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-275.

Lu B, Nagappan G, Guan X, Nathan PJ, Wren P. BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(6):401

Marei H E, Althani A, Suhonen J, El M E, Caceci T. Recent perspective about the amyloid cascade hypothesis and stem cell-based therapy in the treatment of alzheimer's disease. *Frontiers in Clinical Drug Research-Alzheimer Disorders. Curr. top. med. chem.* 2016; 5:3-33.

Md S, Alhakamy N A, Alfaleh M A, Afzal O, Altamimi A S, Iqubal A, Shaik R. A. Mechanisms involved in microglial-interceded Alzheimer's disease and nanocarrier-based treatment approaches. *J. Pers. Med.* 2021; 11(11): 1116.

Mohammadi A, Hosseinzadeh Colagar A, Khorshidian A, Amini SM. The Functional Roles of Curcumin on Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *Neuroimmunomodulation.* 2022; 29(1):4-14.

Mufson EJ, Mahady L, Waters D, Counts SE, Perez SE, DeKosky ST, Ginsberg SD, Ikonovic MD, Scheff SW, Binder LI. Hippocampal plasticity during the progression of Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 2015; 19;309:51-67.

Muller AP, Ferreira GK, da Silva S, Nesi RT, de Bem Silveira G, Mendes C, Pinho RA, da Silva Paula MM, Silveira PCL. Safety protocol for the gold nanoparticles administration in rats. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;1;77:1145-1150.

Muller AP, Ferreira GK, Pires AJ, de Bem Silveira G, de Souza DL, Brandolfi JA, de Souza CT, Paula MMS, Silveira PCL. Gold nanoparticles prevent cognitive deficits, oxidative stress and inflammation in a rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017; 1;77:476-483.

Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao MV, Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski MH. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2009;15(3):331-7.

Notturmo F, Pace M, Zappasodi F, Cam E, Bassetti C L, Uncini A. Neuroprotective effect of cathodal transcranial direct current stimulation in a rat stroke model. *J. Neurol. Sci.* 2014; 342(1-2):146-151.

Organização Pan-americana de Saúde, Organização Mundial de Saúde. Demência uma prioridade de saúde pública. 2013.

Patel SS, Acharya A, Ray RS, Agrawal R, Raghuwanshi R, Jain P. Cellular and molecular mechanisms of curcumin in prevention and treatment of disease. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2020; 60(6):887-939.

Penzes P, Cahill M, Jones K. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 2011; 14, 285–293.

Pinho R A, Hauptenthal D P, Fauser P E, Thirupathi A, Silveira P C. Gold Nanoparticle-Based Therapy for Muscle Inflammation and Oxidative Stress. *J. Inflamm. Res.* 2022; 15:3219.

- Qiu C, Kivipelto M, Von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2022;11(2):111-128.
- Quiroga C, Chaparro RE, Karlinski R, Erasso D, Gordon M, Morgan D, Bosco G, Rubini A, Parmagnani A, Paoli A, Mangar D, Camporesi EM. Effects of repetitive exposure to anesthetics and analgesics in the Tg2576 mouse Alzheimer's model. *Neurotox Res.* 2014; 26(4):414-21.
- Rubio-Perez J M, Morillas-Ruiz J M. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *Sci. World J.* 2012.
- Sajad M, Kumar R, Thakur S C. History in Perspective: The Prime Pathological Players and Role of Phytochemicals in Alzheimer's Disease. *IBRO Neurosci. Rep.* 2022;12:377-389.
- Salminen A, Ojala J, Suuronen T, Kaarniranta K, Kauppinen A. Amyloid-beta oligomers set fire to inflammasomes and induce Alzheimer's pathology. *J Cell Mol Med.* 2008; 12(6A):2255-62.
- Sanati M, Khodaghali F, Aminyavari S, Ghasemi F, Gholami, M, Kebriaeezadeh A, Sharifzadeh M. Impact of gold nanoparticles on amyloid β -induced Alzheimer's disease in a rat animal model: Involvement of STIM proteins. *ACS Chem. Neurosci.* 2019;10(5): 2299-2309.
- SCHELTENS, P. et al. Alzheimer's disease *The Lancet*, 2016.
- Shaw LM, Korecka M, Clark CM, Lee VM, Trojanowski JQ. Biomarkers of neurodegeneration for diagnosis and monitoring therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(4):295-303.
- Shen Y, Hua L, Yeh CK, Shen L, Ying M, Zhang Z, Liu G, Li S, Chen S, Chen X, Yang X. Ultrasound with microbubbles improves memory, ameliorates pathology and modulates hippocampal proteomic changes in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Theranostics.* 2020; 26;10(25):11794-11819.
- Silveira GB, Muller AP, Machado-de-Ávila RA, Silveira PCL. Advance in the use of gold nanoparticles in the treatment of neurodegenerative diseases: new perspectives. *Neural Regen Res.* 2021; 16(12):2425-2426.
- Silveira PCL, Rodrigues MS, Gelain DP, de Oliveira J. Gold nanoparticles application to the treatment of brain dysfunctions related to metabolic diseases: evidence from experimental studies. *Metab Brain Dis.* 2023; 38(1):123-135.
- Silveira PCL, Venâncio M, Souza PS, Victor EG, de Souza Notoya F, Paganini CS, Streck EL, da Silva L, Pinho RA, Paula MM. Iontophoresis with gold nanoparticles improves mitochondrial activity and oxidative stress markers of burn wounds. *Mater. Sci. Eng.* 2014;44:380–385.
- Silveira PCL, Venâncio M, Souza PS, Victor EG, de Souza Notoya F, Paganini CS, Streck EL, da Silva L, Pinho RA, Paula MM. Iontophoresis with gold nanoparticles improves

mitochondrial activity and oxidative stress markers of burn wounds. *Mater. Sci. Eng.* 2014;44:380–385

Sochal M, Ditmer M, Gabryelska A, Białasiewicz P. The Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Immune-Related Diseases: A Narrative Review. *J Clin Med.* 2022; 12;11(20):6023.

SU W S. Transcranial ultrasound stimulation promotes brain-derived neurotrophic factor and reduces apoptosis in a mouse model of traumatic brain injury. *Brain Stimulation.* 2017; 10:1032–1041.

Synaptic Plasticity in Rat Hippocampus. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control.* 2019;66(5):930-938.

Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurobiol.* 2016; 53: 181–1194.

Tang Y, Le W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.* 2016; 53(2): 1181-1194.

Tönnies E, Trushina E. Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease.

Tramontin NDS, Silveira PCL, Tietbohl LTW, Pereira BDC, Simon K, Muller AP. Effects of Low-Intensity Transcranial Pulsed Ultrasound Treatment in a Model of Alzheimer's Disease. *Ultrasound Med Biol.* 2021; 47(9):2646-2656.

Tyler WJ, Lani SW, Hwang GM. Ultrasonic modulation of neural circuit activity. *Curr Opin Neurobiol.* 2018; 50:222-231.

Vassar R, Kuhn P H, Haass C, Kennedy M E, Rajendran L, Wong P C, Lichtenthaler S F. Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: current status and future prospects. *J. Neurochem.* 2014; 130(1):4-28.

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

Wang J, Sui M, Fan W. Nanoparticles for tumor targeted therapies and their pharmacokinetics. *Curr Drug Metab.* 2010;11(2):129-41.

Wasielawska J M, White A R. Focused Ultrasound-mediated Drug Delivery in Humans—a Path Towards Translation in Neurodegenerative Diseases. *Pharm. Res.* 2022;39:1-13.

Yang J, Wise L, Fukuchi K. TLR4 Cross-talk with NLRP3 inflammasome and complement signaling pathways in Alzheimer's disease. *Front. Immunol.* 2020; 11, 724.

Yao L, Chen R, Ji H, Wang X, Zhang X, Yuan Y. Preventive and Therapeutic Effects of Low-Intensity Ultrasound Stimulation on Migraine in Rats. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng.* 2022;30:2332-2340.

Yu H, Wu J. Amyloid- β : A double agent in Alzheimer's disease? *Biomed Pharmacother.* 2021;139:111575.

Zaccaron R P, Barbieri R T, Mendes C, Venturini L M, Alves N, Mariano S D S, Lock Silveira P C. Photobiomodulation associated with lipid nanoparticles and hyaluronic acid accelerate the healing of excisional wounds. *J. Biomater. Appl.* 2022; 37(4): 668-682.

Zhang G, Wang Z, Hu H, Zhao M, Sun L. Microglia in Alzheimer's Disease: A Target for Therapeutic Intervention. *Front Cell Neurosci.* 2021; 24;15:749587.

Zhang J, Yang T, Huang W, Yu Y, Sun T. Applications of Gold Nanoparticles in Brain Diseases across the Blood-Brain Barrier. *Curr Med Chem.* 2022;29(39):6063-6083.

Zheng Y, Zhang X, Zhang R, Wang Z, Gan J, Gao Q, Yang L, Xu P, Jiang X. Inflammatory signaling pathways in the treatment of Alzheimer's disease with inhibitors, natural products and metabolites (Review). *Int J Mol Med.* 2023;52(5):111.

Zhu YG, Chen XC, Chen ZZ, Zeng YQ, Shi GB, Su YH, Peng X. Curcumin protects mitochondria from oxidative damage and attenuates apoptosis in cortical neurons. *Acta Pharmacol. Sin.* 2004, 25, 1606–1612.

ANEXO A



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




CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de 20/09/2022.

Título do projeto	EFEITOS DO TRATAMENTO COM ULTRASSOM TRANSCRANIANO DE BAIXA INTENSIDADE ASSOCIADO AS NANOPARTÍCULAS DE OURO EM UM MODELO DE DOENÇA DE ALZHEIMER
Project title	EFFECTS OF LOW-INTENSITY TRANSCRANIAL ULTRASOUND TREATMENT ASSOCIATED WITH GOLD NANOPARTICLES IN A MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE.
Número do protocolo Protocol number	59/2022
Pesquisador principal Principal Investigator	Paulo Cesar Lock Silveira
Pesquisadores Researchers	Laura de Roch Casagrande, Carolini Mendes, Gustavo de Bem Silveira, João Vitor Silvano Bittencourt, Germano Duarte Porto, Ligia Milanez Venturini, Maria Eduarda Anastácio Borges Corrêa, Rubya Pereira Zaccaron, Mateus Cardoso Colares, Igor Ramos Lima, Gabrielli Martins, Josiane Budni, Eduarda Behenck Medeiros..
Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	30/09/2022 a 30/09/2023
Espécie/Inhagem/raça	Camundongo heterogênico/ BalbC
Idade/Peso	3 meses /30 – 45g
Número de animais	Masculino 90
Procedência	Biotério UNESC

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


Josiane Budni
Coordenadora da CEUA

Criciúma-SC, 20 de setembro de 2022