



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

PRISCILA CARACAS VIEIRA DE SOUSA

**O FLAVONÓIDE ERIODICTIOL PROTEGE CAMUNDONGOS COM DOENÇA DE
ALZHEIMER ESPORÁDICA INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA: ESTUDO
IN VIVO E *IN SILICO***

FORTALEZA

2023

PRISCILA CARACAS VIEIRA DE SOUSA

O FLAVONÓIDE ERIODICTIOL PROTEGE CAMUNDONGOS COM DOENÇA DE
ALZHEIMER ESPORÁDICA INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA: ESTUDO *IN*
VIVO E *IN SILICO*

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade.

FORTALEZA

2023

PRISCILA CARACAS VIEIRA DE SOUSA

O FLAVONÓIDE ERIODICTIOL PROTEGE CAMUNDONGOS COM DOENÇA DE
ALZHEIMER ESPORÁDICA INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA: ESTUDO *IN*
VIVO E *IN SILICO*

Tese de doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia, da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
para obtenção do título de Doutor em
Farmacologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. João Hermínio Martins da Silva
Fundação Oswaldo Cruz Ceará - FIOCRUZ CE

Prof. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia
Universidade Federal do Pará - UFPA

Prof. Dr. Pedro Braga Neto
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Gislei Frota Aragão
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D32f de Sousa, Priscila Caracas Vieira.
O flavonóide Eriodictiol protege camundongos com Doença de Alzheimer Esporádica induzida por estreptozotocina: estudo in vivo e in silico / Priscila Caracas Vieira de Sousa. – 2023.
169 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Geanne Matos de Andrade.
1. Doença de Alzheimer. 2. Diabetes Tipo 3. 3. Eriodictiol. 4. Flavonóide. 5. Neuroinflamação. I. Título.
CDD 615.1
-

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por ter me dado a vida e por sempre me amparar diante dos obstáculos. Obrigada por iluminar meu caminho e por se fazer presente me fazendo persistir e me dando forças para enfrentar todos os momentos ao longo dessa caminhada me ajudando a concluir mais esta etapa da minha vida e trazendo esperanças de um amanhã melhor.

À CAPES, pelo incentivo científico e suporte financeiro para a realização dessa pesquisa e aos animais que mais contribuíram para essas novas descobertas científicas.

Ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da UFC pelo apoio, em especial à coordenação e a secretária Laura da pós-graduação por toda ajuda e disponibilidade de sempre. Também aos Professores do curso por terem transmitido com muita responsabilidade e dedicação seus conhecimentos, com quem tive a oportunidade de aprender muito nas disciplinas ofertadas, contribuindo para o meu crescimento acadêmico.

Aos professores da banca de Exame de Qualificação por todas as importantes sugestões de melhorias e aos professores da banca de defesa por também aceitarem o convite desta tese e que se fazem presentes nesse momento tão especial e importante na minha vida.

À minha orientadora professora Geanne Matos Andrade pela oportunidade, apoio e competência na orientação deste trabalho. Agradeço por sempre acreditar no meu potencial, pelos ensinamentos e pela contribuição tão importante na minha formação científica, mas acima de tudo pela amizade e parceria que sempre admirei. É e foi um prazer estar ao seu lado, e poder dispor de todo seu conhecimento, experiência, carinho e confiança.

Ao Laboratório de Neurociências e Comportamento (LNC) pela oportunidade de trabalhar aqui desde a minha iniciação científica. Aos colegas de bancada meus sinceros agradecimentos a todos vocês, pois reconheço que de forma direta ou indireta, todos contribuíram para essa conquista. À Juliete, Amanda, Jéssica, Alfaete, Tyciane e Gabriele um agradecimento especial pela colaboração na parte experimental deste trabalho, pelas reflexões e momentos de descontração. Acredito que juntos formamos uma grande equipe e agradeço imensamente, por fazerem parte dessa etapa da minha vida.

Aos amigos que passaram pelo LNC ao longo desses anos, meu agradecimento a todos vocês por terem colaborado na minha pesquisa científica. Em especial à Marta, pois tudo que aprendi com você foi de base para esse momento tão importante. A você, minha mais sincera e eterna gratidão e admiração.

A todos os amigos com os quais convivi durante este tempo no Departamento de Fisiologia e Farmacologia e que estão distribuídos pelos diversos laboratórios. Agradeço pelo espírito de colaboração e pela amizade. Em especial, com muito carinho à Sarah e ao Paulo pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. João Hermínio da FIOCRUZ- CE por ter aceito a parceria e ter me recebido tão bem em seu laboratório. À Aline, Luca e Geraldo por toda ajuda e simpatia na

realização dos experimentos *in silico* e na didática e paciência nos ensinamentos em docking e dinâmica molecular. Essa colaboração é muito importante para o nosso laboratório e engrandeceu esta pesquisa. É muito feliz saber que vamos construindo sobretudo amizades ao longo desta jornada.

À minha família por todo o amor e apoio incondicional. Agradeço por sempre terem se esforçado e incentivado minha educação, me apoiado na concretização deste objetivo e entendido os momentos de ausência. Amo vocês!

A todos os meus amigos próximos, pelo amor, força e compreensão, principalmente nos períodos de ausência durante os momentos dedicados à realização deste trabalho. Obrigada pela torcida, companheirismo, amizade e por trazer leveza para minha vida.

Minha humilde e sincera gratidão a todos que, de alguma forma, colaboraram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho. Muito obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menos se lhe faltasse uma gota. ”
(Madre Teresa de Calcutá)

Dedico este trabalho ao meu avô (*in memoriam*) que sempre se esforçou para me dar acesso à educação e me incentivou a estudar para alcançar uma vida melhor. Tenho certeza que seu amor incondicional está acompanhando a realização do nosso sonho de me tornar doutora.

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que causa perda progressiva de memória e outros domínios cognitivos, sendo a forma mais comum de demência e afetando 48,6 milhões de pessoas no mundo. No entanto, pesquisas recentes sugerem que a Doença de Alzheimer Esporádica (DAE) é uma Diabetes tipo 3, caracterizada pela resistência à insulina no cérebro, envolvendo mecanismos moleculares similares aos causadores da Diabetes tipo 2 no tecido periférico. Desse modo, injeções intracerebroventriculares (icv) de estreptozotocina (STZ) têm sido usadas como modelo de indução de diabetes tipo 3 e como modelo experimental da DAE por causar estresse oxidativo e inflamação. O objetivo do trabalho foi estudar os efeitos do eriodictiol, um flavonóide, que possui atividade anti-inflamatória e antioxidante já descritas, sobre déficits cognitivos e dano neuronal em camundongos submetidos ao modelo experimental da DAE. Camundongos Swiss machos (25-35 g) receberam injeções de STZ (3 mg/kg, icv, 1,5 µl) bilateralmente, no dia 1 e 3 do experimento e foram divididos em 5 grupos: Controle; Controle + eriodictiol 4 (ERI 4); STZ; STZ + ERI (2 e 4 mg/kg). O tratamento com eriodictiol foi realizado por 16 dias, iniciando 1 h após o segundo procedimento de indução. Foi feita a medição da glicemia dos animais antes e após a indução da DAE. Os resultados demonstraram que não houve alteração significativa na glicemia. O tratamento melhorou de forma significativa os déficits na memória aversiva, de reconhecimento e espacial e não alterou a atividade locomotora. O efeito neuroprotetor provavelmente se deve a uma ação antioxidante e anti-inflamatória via inativação do GSK-3 β e ativação da via Keap1/Nrf2, destacada nos experimentos *in silico*, que preveniu a redução dos níveis de GSH e diminuiu os níveis de nitrito no hipocampo dos animais, consequentemente, atenuando o processo neuroinflamatório e a resistência à insulina, ressaltando seu potencial preventivo e/ou adjuvante para o tratamento da DAE.

Palavras chave: Doença de Alzheimer Esporádica; Estreptozotocina; Flavonóides; Neuroproteção; Eriodictiol

ABSTRACT

A FLAVONOID ERIODICTIOL PROTECTS MICE WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED SPORADIC ALZHEIMER'S DISEASE: IN VIVO AND IN SILICO STUDY

Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disorder that causes progressive memory loss and other cognitive impairments, being the most common form of dementia and affecting 48.6 million people worldwide. However, recent research suggests that Sporadic Alzheimer's Disease (SAD) is a Type 3 Diabetes, characterized by insulin resistance in the brain, involving molecular mechanisms similar to those causing Type 2 Diabetes in peripheral tissue. Thus, intracerebroventricular (icv) injections of streptozotocin (STZ) have been used as a model of Type 3 diabetes induction and as an experimental model of SAD due to causing oxidative stress and inflammation. This work aimed to study the effects of eriodictyol, a flavonoid with already described anti-inflammatory and antioxidant activity, on cognitive deficits and neuronal damage in mice subjected to the experimental model of SAD. Male Swiss mice (25-35 g) received bilateral STZ injections (3 mg/kg, icv, 1.5 μ l) on day 1 and 3 of the experiment and were divided into 5 groups: Control; Control + eriodictyol 4 (ERI 4); STZ; STZ + ERI (2 and 4 mg/kg). Eriodictyol treatment was carried out for 16 days, starting 1 hour after the second induction procedure. Blood glucose measurement of the animals was performed before and after the induction of SAD. The results showed that there was no significant change in blood glucose. The treatment significantly improved the deficits in aversive, recognition and spatial memory and did not alter locomotor activity. The neuroprotective effect is probably due to an antioxidant and anti-inflammatory action via inactivation of GSK-3 β and activation of the Keap1/Nrf2 pathway, highlighted in the in silico experiments, which prevented the reduction of GSH levels and decreased nitrite levels in the hippocampus of the animals, thus attenuating the neuroinflammatory process and insulin resistance, highlighting its potential for preventive and/or adjuvant treatment of SAD.

Keywords: Alzheimer Disease Sporadic; Streptozotocin; Flavonoid; Neuroprotection; Eriodictyol

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismo fisiopatológico da Doença de Alzheimer	25
Figura 2 - Modulação do estresse oxidativo dependente da dieta	29
Figura 3 - Diagrama esquemático da via de sinalização Nrf2-Keap1- ARE.....	32
Figura 4 - Visão geral da via Nrf2/Keap1/ARE e vias interconectadas	33
Figura 5 - Comparação das estruturas moleculares da glicose e da estreptozotocina (STZ) ...	43
Figura 6 - Neurotoxicidade celular causada pela estreptozotocina (STZ).....	45
Figura 7 - Esqueletos básicos dos flavonoides	50
Figura 8 - Mecanismos de ação in vitro dos flavonoides	52
Figura 9 - Estrutura química do Eriodictiol.....	55
Figura 10 - Vias de sinalização molecular do eriodictiol	56
Figura 11 - Farmacocinética do eriodictiol em humanos	57
Figura 12 - Representação da cirurgia estereotáxica	62
Figura 13 - Desenho experimental	63
Figura 14 - Arena do teste de campo aberto dividido em quatro quadrantes iguais	65
Figura 15 - Fotografia do equipamento para a realização do teste de labirinto em Y.....	65
Figura 16 - Cálculo realizado para que se tenha o resultado do teste.....	66
Figura 17 - Aparelho esquiava passiva	67
Figura 18 - Esquema representando a metodologia do teste de reconhecimento de objetos....	68
Figura 19 - Representação do teste de labirinto aquático	69
Figura 20 - Sistema de western blotting montado	72
Figura 21 - Metodologia computacional	74
Figura 22 - Proteínas-alvo do estudo de interação do ligante eriodictiol por docking molecular	76
Figura 23 - O efeito do tratamento com o eriodictiol no teste do campo aberto	83
Figura 24 - O eriodictiol na memória aversiva	84
Figura 25 - Efeito do eriodictiol sobre a memória de trabalho	85
Figura 26 - Efeito do eriodictiol sobre a memória recente de reconhecimento	86
Figura 27 - Efeito do eriodictiol sobre a memória tardia de reconhecimento	87
Figura 28 - Avaliação da memória espacial (número de cruzamentos e tempo de latência). em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ	88

Figura 29 - Efeito do tratamento com eriodictiol sobre a glicemia	89
Figura 30 - Efeitos do eriodictiol sobre a dosagem de nitrito/nitrato (NO ₂ /NO ₃).....	90
Figura 31 - Efeitos do eriodictiol sobre a peroxidação lipídica (TBARS)	91
Figura 32 - Efeitos do eriodictiol sobre a Glutationa Reduzida (GSH).....	92
Figura 33 - Expressão de GFAP avaliada por Western blotting	93
Figura 34 - Expressão de sinaptofisina avaliada por Western blotting	94
Figura 35 - Afinidade predita pelo docking cego do eriodictiol a dez potenciais alvos proteicos	95
Figura 36 - Localização das três regiões de interação entre IRS1 e eriodictiol.....	96
Figura 37 - Resultados obtidos pelos preditores de cavidade DogSiteScorer e P2Rank para análise de cavidades de IRS1.....	98
Figura 38 - Interação entre IRS1 e eriodictiol com a visualização tridimensional da superfície da proteína e das poses do ligante pelo programa PyMOL.	100
Figura 39 - Diagrama 2D de interações do eriodictiol com IRS1	102
Figura 40 - Dinâmica molecular de complexos eriodictiol/IRS1 nas conformações finais de cada replicata	105
Figura 41 - Localização das regiões de interação entre GSK3 β e eriodictiol.....	107
Figura 42 - Resultados obtidos pelos servidores DogSiteScorer para análise de cavidades de GSK3 β para ligação do eriodictiol	109
Figura 43 - Interação entre GSK3 β e eriodictiol	111
Figura 44 - Diagrama 2D de interações do eriodictiol com GSK3 β	111
Figura 45 - RMSD do eriodictiol ao longo da simulação.....	113
Figura 46 - Dinâmica molecular de complexos eriodictiol/GSK3 β	114
Figura 47 - Efeitos da interação com eriodictiol em GSK3 β	115
Figura 48 - PCA da cadeia principal de GSK3 β na proteína livre e em nos complexos com eriodictiol.....	116
Figura 49 - Localização das regiões de interação entre Keap1 e eriodictiol	118
Figura 50 - Resultados obtidos pelo DogSiteScorer para análise de cavidades de Keap1 para ligação do eriodictiol.	119
Figura 51 - Interação entre Keap1 e eriodictiol com a visualização tridimensional da interação pelo programa PyMOL e a afinidade predita (kcal/mol) de cada pose.	121
Figura 52 - Diagrama 2D de interações do eriodictiol com Keap1	122
Figura 53 - RMSD do ligante ao longo do tempo de simulação.	124
Figura 54 - Efeitos na interação na dinâmica molecular de complexos eriodictiol/Keap1.	125

Figura 55 - Dinâmica molecular de complexos eriodictiol/Keap1.....	125
Figura 56 - Efeitos da interação com eriodictiol em Keap1. PCA da cadeia principal de Keap1 na proteína livre (apo) e em nos complexos com eriodictiol.....	126
Figura 57 - Síntese do mecanismo de ação protetor do eriodictiol em modelo de DAE por STZ	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre o modelo de DAE induzido pela infusão i.c.v de STZ e a DA humana	46
Tabela 2 - Uso dos flavonoides no tratamento de patologias	54
Tabela 3 - Localização das micro-injeções bilaterais de STZ nos ventrículos laterais	61
Tabela 4 - Protocolo experimental	63
Tabela 5 - Configurações de caixa para os cálculos de docking dirigido.....	78
Tabela 6 - Interação entre IRS1 e eriodictiol. Energia (kcal/mol) de cada pose	96
Tabela 7 - Resultados obtidos pelos preditores de cavidade DogSiteScorer para análise de cavidades de IRS1.	97
Tabela 8 - Resultados obtidos pelos preditores de cavidade P2Rank para análise de cavidades de IRS1	98
Tabela 9 - Interação entre IRS1 e eriodictiol com a afinidade (kcal/mol) de cada pose.	102
Tabela 10 - Dinâmica molecular de complexos eriodictiol/IRS1.....	104
Tabela 11 - Interação entre GSK3 β e eriodictiol. Energia (kcal/mol) de cada pose	107
Tabela 12 - Resultados obtidos pelos preditores de cavidade DogSiteScorer para análise de cavidades de GSK3 β	108
Tabela 13 - Resultados obtidos da análise do ranqueamento das quatro cavidades detectadas pelo P2Rank pertencentes ao GSK3 β	109
Tabela 14 - Interação entre GSK3 β e eriodictiol a afinidade predita (kcal/mol) de cada pose	110
Tabela 15 - Dinâmica molecular de dez complexos eriodictiol/GSK3 β	112
Tabela 16 - Interação entre Keap1 e eriodictiol por energia (kcal/mol) de cada pose	117
Tabela 17 - Resultados obtidos pelos preditores de cavidade DogSiteScorer para análise de cavidades de Keap1.	118
Tabela 18 - Resultados obtidos pelos preditores de cavidade P2Rank para análise de cavidades de Keap1.	119
Tabela 19 - Interação entre Keap1 e eriodictiol com a afinidade predita (kcal/mol) de cada pose	120
Tabela 20 - Dinâmica molecular de complexos eriodictiol/Keap1.	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aCSF	Infusão de artificial Fluido Cérebro Espinal
AChEI	Inibidores da enzima acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de Variância
APOE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora de amilóide
AREs	Elementos de Resposta Antioxidante
AVs	Vacúolos autofágicos
BHE	Barreira hematoencefálica
bZip	Zíper de leucina básico
CAT	Catalase
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CNC	Cap 'n' collar
CONCEA	Conselho Nacional de controle de Experimentação Animal
CPF	Córtex pré-frontal
CST	Terapia de Estimulação Cognitiva
DA	Doença de Alzheimer
DAE	Doença de Alzheimer Esporádica
DAE	Doença de Alzheimer Esporádica
DAIP	Doença de Alzheimer de Início Precoce
DASH	Abordagem dietética para parar a hipertensão
DM	Dinâmica molecular
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2

DNTB	Ácido dinitrobenzóico
DP	Doença de Parkinson
ENFs	Emaranhados neurofibrilares
EPM	Erro padrão médio
ERI2	Eriodictiol
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GCL	Glutamato-cisteína ligase
GCL	Glutamato-cisteína ligase
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GLUT 4	Transportador de glicose dependente de insulina 4
GLUT	Transportadores de glicose independentes de sódio
GLUT2	Transportador de glicose tipo 2
GPX	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSK3	Glicogênio sintase cinase
GSSG	Glutaciona oxidada
HMR	Particionamento de Massa de Hidrogênio
HO-1	Heme Oxigenase
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL-1 β	Interleucina-1beta
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IR	Receptor de insulina

IR1	Receptor de insulina subtipo 1
IRS1	Receptor de insulina tipo 1
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potencialização de longa duração
MAPK	Mitógeno
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos-
MDA	Malondialdeído
MIND	Intervenção da dieta mediterrânea DASH para atraso neurodegenerativo
MR	Memória recente
MT	Memória tardia
NO2	Nitrito
NO3	Nitrato
NQO1	NADPH quinona oxidoreductase
Nrf2	Fator nuclear derivado de eritróide 2
NVT	Volume constante
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC	Componentes principais
PCA	Análise de Componente Principal
PDB	Protein Data Bank
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PHF	Filamentos pareados helicoidais
PI3K	Enzima fosfatidilinositol-3 cinase
PKA	Proteína quinase A
PME	Particle Mesh Ewald

PVDF	Membrana de difluoreto de polivinildieno
REL	Retículo endoplasmático
RLs	Radicais livres
RM	Ressonância magnética
RMSD	Desvio quadrático médio
RMSF	Flutuação quadrática média
RO	Teste de Reconhecimento de Objetos
ROIs	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SGLT	Transportadores de glicose dependentes de sódio
SOD	Enzimas superóxido dismutase
SPECT	Tomografia por emissão de fóton único
STZ	Estreptozotocina
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TC	Tomografia computadorizada
TCA	Ácido tricloro acético
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Universidade Federal do Ceará
VCAM- 1	Molécula de adesão celular vascular-1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Histórico da Doença de Alzheimer (DA)	22
1.2	Epidemiologia da DA	22
1.3	Fisiopatologia da DA	23
1.4	Inflamação e Estresse Oxidativo na DA	27
1.5	Alterações histopatológicas na DA	34
1.6	Sintomatologia da DA	34
1.6.1	<i>Memória e DA</i>	35
1.7	Diagnóstico da DA	37
1.8	Diabetes tipo 3 e DA	38
1.9	Modelos experimentais da DA	41
1.10	Modelo de DAE por estreptozotocina (STZ)	42
1.11	Tratamento da DA	47
1.12	Flavonóides	48
1.13	Eriodictiol	54
2	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	58
3	OBJETIVOS	59
3.1	Objetivos gerais	59
3.2	Objetivos específicos	59
4	MATERIAIS E METODOLOGIA	60
4.1	Experimentos <i>in vivo</i>	60
4.1.1	<i>Animais</i>	60
4.1.2	<i>Drogas</i>	60
4.1.3	<i>Modelo de Doença de Alzheimer Esporádica (DAE) induzido por Estreptozotocina (STZ i.c.v.)</i>	60

4.1.4 Protocolo Experimental.....	62
4.1.5 Dosagem da glicemia	64
4.1.6 Testes comportamentais	64
4.2 Experimentos <i>in vitro</i>	69
4.2.1 Avaliação do Estresse Oxidativo	69
4.2.2 Avaliação da neuroinflamação e sinaptotoxicidade	71
4.3 Experimentos <i>in silico</i>	72
4.3.1 Avaliação por docking molecular.....	74
4.3.2 Simulações de Dinâmica Molecular.....	78
4.4 Análise estatística	80
5 RESULTADOS	82
5.1 Experimentos <i>in vivo</i>	82
5.1.1 Efeitos do eriodictiol sobre a atividade locomotora (Teste do Campo aberto) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção i.c.v de STZ	82
5.1.2 Efeitos do eriodictiol sobre a memória aversiva (Teste da Esquiva Passiva) de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ.....	83
5.1.3 Efeitos do eriodictiol sobre o déficit na memória de trabalho (Teste do Labirinto em Y) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ	84
5.1.4 Efeitos do eriodictiol sobre o déficit na memória de reconhecimento (Teste de Reconhecimento de Objetos) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ.....	85
5.1.5 Efeitos do eriodictiol sobre o déficit na memória espacial (Teste do Labirinto Aquático) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ i.c.v.....	87
5.2 Experimentos <i>in vitro</i>	89
5.2.1 Níveis de glicose no sangue periférico em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ i.c.v.....	89
5.2.2 Efeitos do eriodictiol (4 mg/kg) sobre a dosagem de nitrito/nitrato (NO ₂ /NO ₃) em tecidos cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ i.c.v.....	89

5.2.3 Efeitos do eriodictiol (4 mg/kg) sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em tecidos cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ i.c.v.....	91
5.2.4 Efeitos do eriodictiol (4 mg/kg, v.o) sobre a Glutathiona Reduzida (GSH) em tecidos cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ	92
5.2.5 Efeitos do eriodictiol sobre a imunorreatividade de GFAP através da técnica de Western-blot em tecidos cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ i.c.v	93
5.2.6 Efeitos do eriodictiol sobre a imunorreatividade de sinaptofisina através da técnica de Western-blot em tecidos cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ i.c.v	94
5.3 Experimentos <i>in silico</i>	95
5.3.1 Identificação de possíveis alvos do eriodictiol.....	95
5.3.2 Efeitos do eriodictiol sobre IRS1	96
5.3.3 Efeitos do eriodictiol sobre GSK3 β	107
5.3.4 Efeitos do eriodictiol sobre Keap1	117
6 DISCUSSÃO DE RESULTADOS	127
7 CONCLUSÕES	142
8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	143
9 REFERÊNCIAS.....	144

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico da Doença de Alzheimer (DA)

Em 1906, o Dr. Alois Alzheimer, a quem a doença foi posteriormente nomeada, notou mudanças no tecido cerebral de uma mulher de 55 anos que havia morrido de uma “doença incomum do córtex cerebral”. Seus sintomas haviam começado aos 51 anos e incluíam perda de memória, desorientação, problemas de linguagem e comportamento imprevisível. Na autópsia *post-mortem*, o Dr. Alois Alzheimer encontrou emaranhados neurofibrilares anormais no cérebro da paciente, sendo o primeiro a descrevê-los (ALZHEIMER *et al.*, 1995). Contudo, somente em 1910, Kraepelin nomeou a doença como 'doença de Alzheimer' na 8ª edição do 'Manual de Psiquiatria' (KRAEPELIN, 1910).

1.2 Epidemiologia da DA

O número de pessoas idosas cresce de forma acelerada em países em desenvolvimento como o Brasil e, conseqüentemente, aumenta a importância à atenção a doenças relacionadas ao envelhecimento, como a demência que é a principal causa de dependência de pessoas idosas (ZALLI; FARAH; ANTUNES, 2020).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) aprovou, em Genebra, na Suíça, o Plano de Ação Global para as Demências 2017 – 2025, adotado por 194 países, ressaltando a necessidade urgente de medidas por parte dos governos quanto ao cuidado às pessoas com demência. Atualmente, há cerca de 55 milhões de pessoas com demência em todo o mundo, desse total, 70% residem em países com baixo desenvolvimento econômico (OMS, 2022). No Brasil são 2 milhões de pessoas com demência e estimativas sugerem que há 70% de casos não diagnosticados (PROAD, 2022).

Segundo estimativas do projeto *Global Burden of Disease*, os números poderão chegar a mais de 150 milhões até 2050, devido ao envelhecimento da população que, associado ao aumento da prevalência de fatores de risco relacionados à demência, leva o Brasil à segunda maior prevalência de demência padronizada por idade no mundo (ZALLI, 2020; FETER, 2021).

Atualmente, a incidência de novos casos por ano é quase 10 milhões, sendo a Doença de Alzheimer (DA) a mais representativa, podendo contribuir em 60-70% dos casos (OMS, 2022). No Brasil, a prevalência de demência na população com mais dos 60 anos é estimada entre 5,1% e 17,5%, sendo a DA a causa mais frequente dos casos (LAGINESTRA-

SILVA *et al.*, 2021). A DA é um distúrbio cerebral irreversível que danifica a memória e a cognição de forma lenta e progressiva. Embora a demência seja mais comum à medida que as pessoas envelhecem, a DA não é um processo normal do envelhecimento (NIA, 2021).

A DA atinge ambos os sexos, mas mulheres parecem ter uma maior propensão a desenvolver a doença, no entanto os fatores que geram esta disparidade ainda não são bem compreendidos (NIA, 2022). Além disso, negros e hispânicos também parecem ser mais propensos do que os brancos a ter Alzheimer ou outras demências (O'BRYANT *et al.*, 2022). Dados da literatura indicam que 19% dos negros e 14% dos adultos hispânicos com 65 anos ou mais têm DA em comparação com 10% dos idosos brancos (ASSOCIAÇÃO AZHEIMER, 2022).

Cerca de 1 em cada 9 pessoas (10,7%) com 65 anos ou mais tem Alzheimer, esse percentual aumenta com a idade, 13,1% entre 75 a 84 anos; e 33,2% acima de 85 (DEMENTIA FORECASTING COLLABORATORS, 2022). Verificou-se que 10% dos casos de DA com menos de 65 anos apresentam associação genética, com hereditariedade autossômica dominante e penetrância entre 92 a 100% dos portadores e é conhecido como doença de Alzheimer de Início Precoce (DAIP), sendo o gene PSEN1 (presenilina 1) responsável por 70% das mutações, das quais a *L166P* é associado à ocorrência da doença abaixo dos 30 anos (RIBEIRO; DOS SANTOS; DE SOUZA, 2021).

A DA pode prejudicar a capacidade de pensar, aprender e lembrar (NIA, 2022), impactando a qualidade de vida do indivíduo. Assim, DA é classificada em 2 tipos: familiar ou de início precoce e esporádica ou de início tardio. A DA de início precoce é considerada uma consequência de mutações genéticas autossômicas dominantes raras e representam um pequeno número de casos quando comparada a DA esporádica (LOPEZ; GONZÁLEZ; LÉGER, 2019).

Além disso, essas demências também impactam a qualidade de vida do cuidador e custam bilhões aos cofres públicos, por exemplo, em 2022 os gastos no tratamento de indivíduos com algum tipo de demência somente nos EUA foram de U\$321 bilhões (DEMENTIA FORECASTING COLLABORATORS, 2022).

Com relação aos fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da DA, estudos corroboram que pessoas portadoras de doença metabólicas, principalmente com Diabetes tipo 2 (DM2) e obesidade, possuem maior predisposição a desenvolver DA pelo processo inflamatório associado ao distúrbio metabólico (NICOLETTI; SOUZA, 2021).

1.3 Fisiopatologia da DA

As principais características fisiopatológicas da DA consistem em alterações histopatológicas, pois observa-se a presença extracelular de placas senis (formadas pelo peptídeo beta amiloide - $A\beta$), de emaranhados neurofibrilares (ENFs) intracelulares e outros neurofilamentos (NFs) formados pela proteína tau hiperfosforilada, constituindo os filamentos pareados helicoidais (PHF-tau). Também se observa perda neuronal e sináptica caracterizada por uma maciça morte neuronal que levam a atrofia no hipocampo e em diversas áreas do neocórtex, particularmente nos lóbulos frontal e temporal (BLENNOW *et al.*, 2006; LOPEZ; GONZÁLEZ; LÉGER, 2019), causando perda de memória, comprometimento cognitivo e alteração comportamental que, em última instância, leva à demência e à morte (RAVI *et al.*, 2018).

Com relação à formação das placas senis, normalmente, a proteína precursora de amiloide (APP, do inglês *Amyloid Precursor Protein*) é clivada na via não amiloidogênica pelas enzimas α -secretase (ADAM-10), seguida da γ -secretase, gerando peptídeos solúveis, contudo, na DA ocorre clivagem alternativa por β -secretases (BACE-1). Nessa via amiloidogênica da DA, ocorre a respectiva clivagem pela γ -secretase gerando os oligômeros ($A\beta$ -40/ $A\beta$ -42) insolúveis, que se agregam no espaço extracelular, desencadeando cascatas de eventos patológicos (LANE; HARDY; SCHOTT, 2018; PARKIN *et al.*, 2022) (Figura 1).

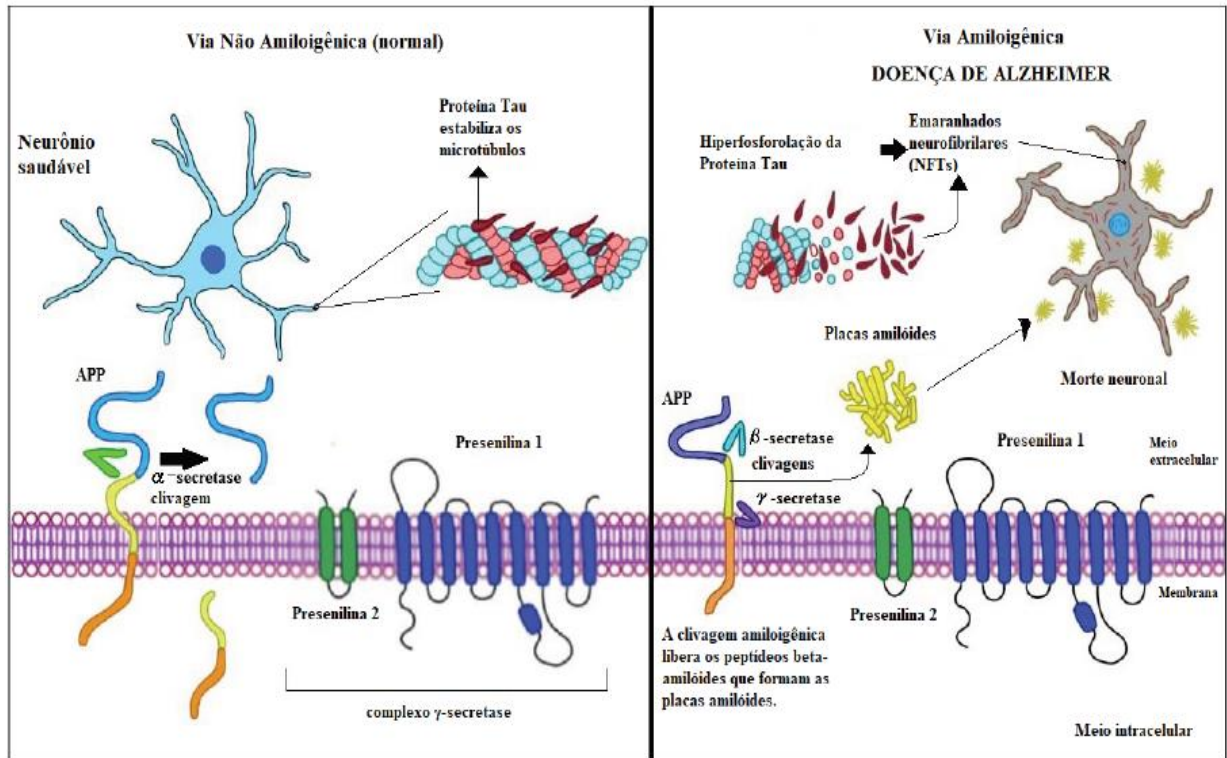
O peptídeo $A\beta$ se acumula através de uma via de agregação com diferentes monômeros, oligômeros, fibrilas e placas amiloides (RIBEIRO; DOS SANTOS; DE SOUZA, 2021). Os oligômeros $A\beta$ são as espécies mais tóxicas, pois eles causam liberação de cálcio intracelular, falha mitocondrial, desencadeiam resposta inflamatória, estresse oxidativo, comprometimento transcricional, perda sináptica e, finalmente, morte neuronal. Além disso, podem induzir a hiperfosforilação da tau gerando NFs. Destacando que a forma mais tóxica é a de $A\beta$ -42, pois é a mais amiloidogênica e a utilizada como biomarcador precoce da doença. (RODA *et al.*, 2022).

A proteína Tau tem como principal função estabilizar microtúbulos intraneuronais e também participa de vários processos fisiológicos, incluindo mielinização, transporte axonal, neurogênese, função motora, aprendizado e memória, excitabilidade neuronal, metabolismo da glicose, homeostase do ferro e proteção do DNA (KENT; SPIRES-JONES; DURRANT, 2020).

Na DA, a tau sofre hiperfosforilação e reorganiza-se em ENFs, regulando negativamente sua capacidade de interagir com os microtúbulos, que colapsam e desencadeiam vias neuro inflamatórias, podendo levar a apoptose e consequente morte neuronal (Figura 1). Vale ressaltar que a Tau fosforilada agregada é presente no cérebro humano com DA, mas nem

toda tau fosforilada é agregada, portanto ainda não se sabe ao certo se a fosforilação de Tau funciona como gatilho para a agregação (RODA *et al.*, 2022).

Figura 1 - Mecanismo fisiopatológico da Doença de Alzheimer a partir da clivagem da APP



Fonte: Ribeiro; Dos Santos; De Souza (2021). Fisiologicamente, a proteína precursora de amiloíde (APP) é clivada na via não amiloidogênica pelas enzimas α -secretase (ADAM-10), seguida da γ -secretase, gerando peptídeos solúveis. Na DA ocorre a via amiloidogênica com a clivagem alternativa por β -secretases (BACE-1) e pela γ -secretase gerando os oligômeros ($A\beta$ -40/ $A\beta$ -42) insolúveis, que se agregam no espaço extracelular, desencadeando cascatas de eventos patológicos. A proteína Tau também participa de vários processos fisiológicos, incluindo mielinização, transporte axonal, aprendizado e memória. Na DA, a Tau sofre hiperfosforilação e reorganiza-se em emaranhados neurofibrilares (ENFs), regulando negativamente sua capacidade de interagir com os microtúbulos, que colapsam e desencadeiam vias neuro inflamatórias, podendo levar a apoptose e consequente morte neuronal.

Na Doença de Alzheimer de Início Precoce (DAIP), os genes mais comumente relacionados são APP, PSEN1, PSEN2 e MAPT, onde as mutações genéticas afetam o metabolismo e a estrutura destas proteínas, resultando em acúmulos de peptídeo $A\beta$, causando neuroinflamação e neurotoxicidade que aceleram a neurodegeneração (RIBEIRO; DOS SANTOS; DE SOUZA, 2021).

As mutações no gene APP levam à agregação da proteína em placas amiloides neurodegenerativas e todas as mutações descritas para MAPT estão associadas a um aumento dos emaranhados neurofibrilares. Contudo, novos estudos apresentam outros genes candidatos, bem como a importância de alterações epigenéticas na gênese desta doença (RIBEIRO; DOS SANTOS; DE SOUZA, 2021).

A apolipoproteína E (APOE) tem como principal função mediar o transporte lipídico no cérebro e na periferia (RAULIN *et al.*, 2022). No entanto, vários estudos também demonstraram que os receptores APOE desempenham um papel importante na modulação do tráfego de APP, na produção de beta-amilóide (A β) (YU; TAN; HARDY, 2014) e na neuroinflamação (KLOSKE, *et al.*, 2020).

Alelos (ϵ 2, ϵ 3 e ϵ 4) da APOE foram descritos como fatores de risco para DA pela primeira vez em 1993 (CORDER *et al.*, 1993) e são o resultado de polimorfismos que causam alterações de aminoácidos nas posições 112 e 158 da proteína APOE (YU; TAN; HARDY, 2014). O alelo ϵ 3 é a variante mais comum na população em geral, já o polimorfismo ϵ 4 influencia o aumento no risco de DAIP elevando as chances em três vezes para portadores heterozigotos e entre oito a dez vezes para os homozigotos, do contrário, o alelo ϵ 2 está relacionado a um menor risco de DAIP (BELLOY *et al.*, 2019).

Recentemente, foi observado que a autofagia é marcadamente prejudicada na DA, causada pela diminuição da acidificação de autolisossomas aumentados nos neurônios. Esse processo está associado à redução da atividade da enzima vATPase e ao acúmulo de A β /APP- β CTF (beta-amilóide / fragmento carboxi-terminal da proteína precursora de amiloide), gerando vacúolos autofágicos (AVs) A β -positivos que se acumulam formando rosetas, denominado PANTHOS (LEE *et al.*, 2022). Esse processo ocorre bem antes da deposição de amiloide extracelular e é acompanhada por neuroinflamação com invasão microglial. Análises quantitativas confirmam que neurônios individuais exibindo PANTHOS são a principal fonte de placas senis em modelos de DA induzido por A β (LEE *et al.*, 2022).

Contudo, a falta de sucesso na aprovação de qualquer terapia anti-A β e a baixa correlação encontrada entre o declínio cognitivo e a ocorrência de placas amilóides, mesmo com os novos tratamentos recentemente aprovados anti-amilóide: Lecanemab e Adecantumab que foram recentemente aprovados pela FDA, ainda geram o questionamento se o acúmulo de A β é realmente o responsável por desencadear a neurodegeneração na DA (RODA *et al.*, 2022)..

Outros mecanismos fisiopatológicos incluem disfunção sináptica, depleção de neurotransmissores (principalmente acetilcolina) e neurotrofinas, disfunção mitocondrial e das vias de sinalização da insulina, estresse oxidativo, inflamação, alterações vasculares e do metabolismo do colesterol (SMID *et al.*, 2022).

A redução na transmissão sináptica ocorre na fase inicial da doença, no entanto a morte neuronal no início não é suficientemente grande para explicar a perda sináptica, sugerindo a disfunção na plasticidade sináptica antecede a neurodegeneração (SCHEFF *et al.*, 2006). Esta disfunção é caracterizada pela redução do número de sinapses e pela atividade

anormal de redes neurais, interferindo nos mecanismos de aprendizagem e causando uma hiperestimulação neurotóxica que leva à neurodegeneração (HUANG; MUCKE, 2015).

A sinaptofisina (SYN) é uma proteína associadas à membrana pré-sináptica que pode ser encontrada em todas as terminações nervosas do sistema nervoso central e periférico, e atua regulando a fusão das vesículas sinápticas e a liberação de neurotransmissores, sendo um marcador importante da sinaptogênese (ZHANG et al., 2014). A sinaptofisina Ié conhecida por induzir o aumento do número e a densidade das sinapses neuronais, atuando no desenvolvimento neural, sendo um indicador de plasticidade e de transmissão neuronal, com efeito positivo na função cognitiva (ZHANG et al., 2014).

1.4 Inflamação e Estresse Oxidativo na DA

O estresse oxidativo tem sido associado ao início e progressão da DA (FISCHER; MAIER, 2015; KIM et al., 2015), pois pode induzir dano lipídico na membrana, alterações nas enzimas críticas para a função neuronal e glial e dano estrutural ao DNA, levando a dano tecidual, disfunção de sinapse e morte celular (HUANG et al., 2016). Por isso, supõe-se que o estresse oxidativo seja o mecanismo causal subjacente da patologia da DA (TANGNEY, 2014). Conseqüentemente, o estresse oxidativo é um importante fator de risco para a DA e é sugerido como um possível desencadeador da DAE (HERNÁNDEZ-ZIMBRÓN; RIVAS-ARANCIBIA, 2015).

O estresse oxidativo tem sido definido com um distúrbio no balanço pró-oxidante e antioxidante em favor do primeiro, levando a reações potencialmente deletérias em lipídeos, proteínas, RNA e DNA (CASTORA *et al.*, 2022). Essas reações podem incluir: peroxidação dos ácidos graxos das membranas celulares; oxidação dos grupos sulfidríla e inativação enzimática; inibição da síntese de ATP e consumo das reservas de dinucleotídeos adenínicos da nicotinamida; inibição da bomba de Na^+/K^+ ; alterações do DNA que levam à mutagênese ou apoptose e inativação direta do óxido nítrico (NO), que também é envolvido na neurotransmissão (BISHT; SHARMA; TREMBLAY, 2018).

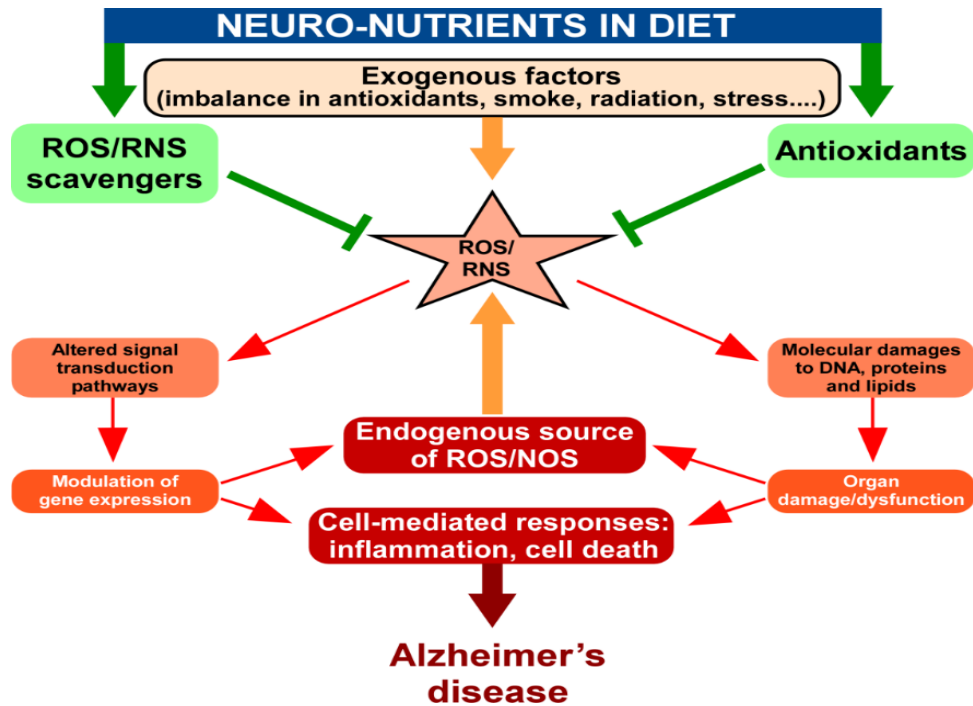
Os radicais livres (RLs) são espécies altamente reativas que contêm um ou mais elétrons não pareados e, em sistemas biológicos, os RLs gerados a partir de oxigênio e nitrogênio são classificados como espécies reativas de oxigênio (EROs ou ROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs ou RNs). Esses radicais são produzidos fisiologicamente devido ao metabolismo celular e são altamente controlados por sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Em concentrações baixas e moderadas participam de cascatas de sinalização

celular e, dessa maneira, modulam genes envolvidos no reparo de DNA, no controle do ciclo celular, da resposta inflamatória e da apoptose (LU *et al.*, 2011).

Uma das consequências de aumento de EROs é a peroxidação lipídica, que se refere a deteriorização oxidativa de lipídios que contenham carbono insaturados, tais como ácidos graxos insaturados, glicolipídeos, ésteres de colesterol e colesterol. A peroxidação lipídica altera estrutura e permeabilidade de membranas celulares e pode culminar com a morte celular. (DE LA MONTE; 2014). As EROs atacam os ácidos graxos poliinsaturados e grupamentos metil com átomos de hidrogênio reativos, ocorrendo reações em cadeia e como resultado ocorre a produção de malonaldeído (MDA).

Através da ação de mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, os sistemas biológicos mantêm as concentrações de RLs dentro de limites fisiológicos (REMACLE *et al.*, 1992). Os sistemas não enzimáticos são compostos por moléculas capazes de neutralizar os RLs através da doação ou captação de elétrons. Essas moléculas podem reagir diretamente com espécies reativas, neutralizando-as e tornando-se radicais menos reativos, como por exemplo, o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol, GSH, carotenóides e polifenóis (CASTORA *et al.*, 2022) (Figura 2).

Figura 2 - Modulação do estresse oxidativo dependente da dieta



Fonte: Castora *et al.* (2022). O estresse oxidativo está envolvido principalmente no desenvolvimento e progressão de muitas doenças neurodegenerativas. Vários eventos, incluindo excitotoxicidade, disfunção mitocondrial, sobrecarga de Ca^{2+} e estresse do retículo endoplasmático, estão associados ao acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), levando à oxidação de proteínas, lipídios e DNA. A exposição contínua de ROS/RNS leva à ativação de enzimas antioxidantes e sistemas de reparo e altera a função de fatores de transcrição e quinases, modulando assim a expressão de vários genes. Algumas modificações da transcrição gênica também podem ser mediadas por citocinas liberadas em resposta a ROS/RNS. Nesse contexto, as atividades antioxidantes e de eliminação de neuronutrientes, como fitoquímicos, vitaminas, hormônios e fatores neurotróficos, limitam a extensão da progressão da doença neurodegenerativa ao aliviar o estresse oxidativo.

O sistema enzimático é composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX). A SOD atua metabolizando o ânion superóxido e assim formando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MCCORD; FRIDOVICH, 1969). O H_2O_2 pode ser metabolizado através de duas vias antioxidantes: catalase e o sistema glutathione. O sistema glutathione peroxidase atua no citoplasma e na mitocôndria e é composto por glutathione reduzida (GSH), glutathione oxidada (GSSG) e glutathione peroxidase (GPX). A glutathione constitui o tiol redutor mais abundante no meio intracelular (REMACLE *et al.*, 1992).

Os EROs também podem provocar efeitos na cascata de sinalização intracelular de insulina, podendo levar à formação de placas beta-amiloides e emaranhados neurofibrilares de tau fosforilada (MENG *et al.*, 2004). Essas alterações moleculares levam à resistência à insulina cerebral, e que é uma característica tanto do mecanismo patogênico da doença quanto do quadro tardio da DAE, havendo um aumento do quadro de resistência conforme a patologia progride (LIU *et al.*, 2011).

1.4.1 Via Nrf2/KEAP-1 na DA

Aproximadamente 1% a 10% de nossos genes são regulados por Keap1-Nrf2 (*Transcription factor nuclear factor erythroid 2-related factor 2* - Nrf2 and *Kelch-like ECH-associated protein1* - Keap1), um intrincado sistema de sinalização sensível ao estado redox intracelular (RAVULA *et al.*, 2021). Esta via também representa o melhor mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo e o dano xenobiótico (ação sinérgica de diferentes substâncias químicas estranhas ao organismo que aumentam os danos celulares), controlando um grupo de proteínas citoprotetoras ao nível da transcrição celular pela ligação aos Elementos de Resposta Antioxidante (AREs) (NITURE; KHATRI; JAISWAL, 2014).

Atualmente é intensamente estudado que a ativação da sinalização Keap1-Nrf2-ARE pode fornecer proteção contra várias doenças relacionadas ao estresse e à inflamação, incluindo doenças neurodegenerativas, pois essa via é o melhor mecanismo de defesa que controla o dano xenobiótico e o estresse oxidativo. Além disso, a via Keap1-Nrf2-ARE também está envolvida no início de várias vias que mantêm o metabolismo e o equilíbrio redox celular, controlando um grupo de proteínas citoprotetoras ao nível da transcrição (CUADRADO *et al.*, 2018).

Em condições normais, a via tem a proteína Nrf2 que é alvo para degradação proteossômica dependente de ubiquitina. Quando o Nrf2 é translocado para o núcleo forma heterodímeros com outros fatores de transcrição, como c-Jun e Maf, se ligando a ARE (região regulatória do DNA) e estimula a transcrição de genes que expressam uma série de proteínas citoprotetoras, antioxidantes, reguladoras, proteínas estruturais e enzimas de desintoxicação de fase II [Glutathione peroxidase (GPx), Glutamato-cisteína ligase (GCL), Heme Oxigenase (HO-1), NADPH quinona oxidoreductase (NQO1) e membros da família da glutathione S transferase] crucial para a sobrevivência celular, metabolismo e homeostase redox (OH; JUN, 2017). A c-Jun age como um ativador transcricional e as Mafs como inativador da transcrição após interação com Nrf2 binding (REDDY, 2008) (Figura 3). Porém, em caso de estresse oxidativo (exposição das células a eletrófilos), o Nrf2 é liberado da degradação mediada por Keap1 pelo proteossoma, interrompendo a via (JIANG *et al.*, 2019).

O *Kelch-like ECH-Associating protein 1* (Keap1) é o principal regulador do fator nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf2), no qual seu domínio BTB (n-terminal) medeia a homodimerização e a ligação de Keap1 a Cul3 (Cullin3), uma proteína de suporte entre Nrf2 e a ubiquitina ligase 3 (E3) (MOU *et al.*, 2020). Em condições basais, Keap1 atua como um

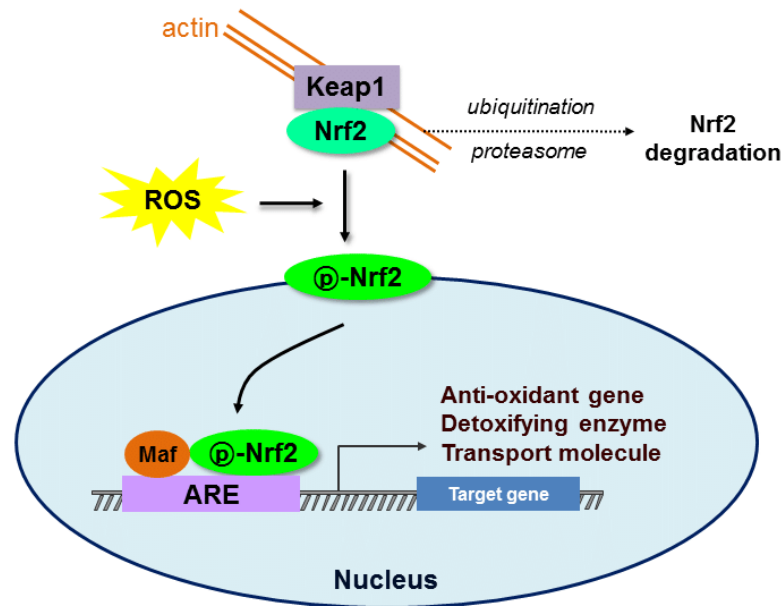
componente adaptador na ligase E3 baseada em Culins3 (Cul3) para mediar a ubiquitinação de Nrf2, que resulta na degradação proteossômica de Nrf2 e mantém o conteúdo celular de Nrf2 em um nível baixo (NITURE; KHATRI; JAISWAL, 2014) (Figura 3).

Contudo, ao detectar o distúrbio redox intracelular em condições de estresse, Keap1 pode ativar o sistema citoprotetor baseado em Nrf2 (SUZUKI; YAMAMOTO, 2015), pois o excesso de insultos oxidativos e eletrofílicos pode modificar covalentemente os resíduos sensíveis na proteína Keap1, induzindo as mudanças de conformação do complexo Cul3-Keap1-Nrf2 para impedir a ubiquitinação de Nrf2 (SIHVOLA; LEVONEN, 2017; JIANG et al., 2019). A inativação da ligase Keap1- Cul3 E3 pode permitir que o Nrf2 (recentemente sintetizado) contorne a degradação dependente da ubiquitinação, resultando assim na elevação e translocação nuclear de Nrf2 e na ativação de genes regulados por Nrf2 (HARDER et al., 2015).

A Nrf2 é um fator de transcrição do tipo Zíper de leucina básico (bZip), pertence à família cap 'n' collar (CNC) e possui 6 domínios (Neh1-Neh6). A região básica acima do zip de leucina é a responsável pela interação desses fatores de transcrição com o DNA (NITURE et al., 2010). O Neh1 possui o Bzip, Neh2 é o domínio que regula negativamente a ação do Nrf2 se ligando a proteínas, como o Keap1, sendo a porção hidrofílica de Neh2 que interage com o domínio KIR (Kelch) do repressor Keap 1 (ITOH et al., 1999). Os domínios Neh 3,4 e 5 se ligam a co-ativadores e Neh 6 é uma região reguladora independente de Keap 1 (BAIRD et al., 2014).

Estudos mostraram que camundongos Knockout para Nrf2 aumentam a suscetibilidade a substâncias tóxicas, a doenças associadas a estresse oxidativo e ao envelhecimento (KENSLEER; WAKABAYASHI; BISWAL, 2007). Além disso, a ativação farmacológica da via Nrf2 têm mostrado efeito neuroprotetor aos danos oxidativos (LEE; SURH, 2005). Assim, esta via de sinalização é fundamental para a expressão de moduladores antioxidantes e anti-inflamatórios que atuam na prevenção e na terapia de doenças que envolvem estresse oxidativo e inflamação como na DA, Diabetes Tipo 2 e Doença de Parkinson (RAVULA et al., 2021).

Figura 3 - Diagrama esquemático da via de sinalização Nrf2-Keap1- ARE

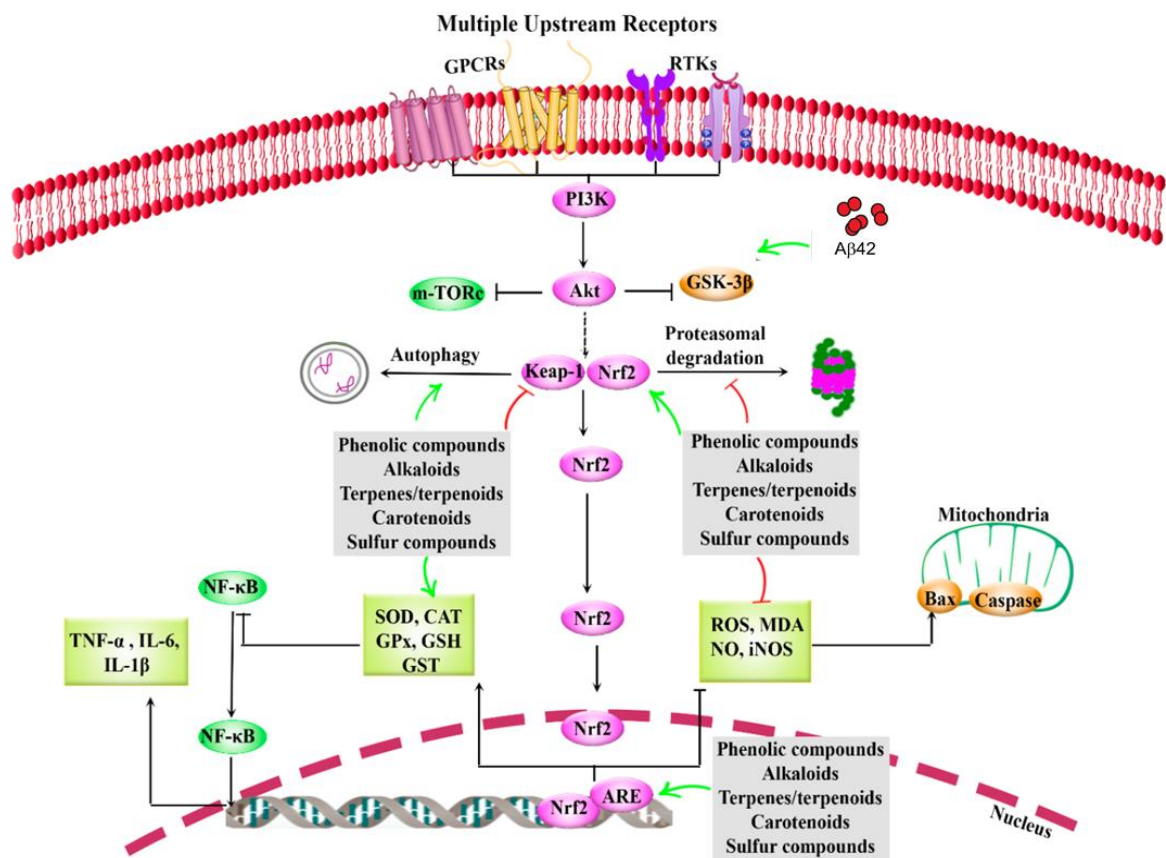


Fonte: Oh Jun (2017).

Essa sinalização Nrf2-Keap1-ARE é afetada pela interação com vários outros sistemas de sinalização intracelular tais como as proteínas quinases (*mitogen-activated protein kinase* - MAPK, *glycogen synthase kinase -3* - GSK3, *protein kinase C* - PKC, *phosphatidylinositide 3-kinase* - PI3K, entre outros) e fosfatases que também regulam por fosforilação dos resíduos de serina no Nrf2, permitindo que ele migre para o núcleo celular (RAVULA *et al.*, 2021).

A inflamação observada precocemente na DA é um novo alvo terapêutico estudado (DAVIES; ADLIMOGHADDAM; ALBENSI, 2021). Na DA a translocação nuclear da Nrf2 é prejudicada, pois, além dos EROs, os oligômeros A β 42 e a fosforilação de Tau inibem sua atividade pela sinalização de GSK-3 (KERR *et al.*, 2017). Contudo, estudos corroboram que a administração de ativadores da via Nrf2, inibidores de Keap1 e GSK3 tem potencial de reverter e prevenir os déficits de memória e de plasticidade sináptica em modelos de roedores (CUADRADO *et al.*, 2019; FAKHRI *et al.*, 2020; DAVIES; ADLIMOGHADDAM; ALBENSI, 2021) (Figura 4).

Figura 4 - Visão geral da via Nrf2/Keap1/ARE e vias interconectadas, assim como alguns alvos fitoquímicos



Fonte: Adaptado de Fakhri *et al.* (2020) e Kerr *et al.* (2017). Os fitoquímicos ativam a via Nrf2, ARE gerando, por exemplo, SOD, CAT, GPx, GSH, GST e autofagia, enquanto inibem Keap1 e, conseqüentemente, mediadores oxidativos (por exemplo, ROS, MDA, NO, iNOS) e inflamatórios (IL, TNF- α , NF- κ B). As setas verdes: ativação ou regulação positiva, \perp vermelho: inibição ou regulação negativa, ARE: elemento de resposta antioxidante, CAT: catalase, GPCRs: receptores acoplados à proteína G, GPx: glutatona peroxidase, GSH: glutatona, GSK-3 β : glicogênio sintase quinase 3-beta, GST: glutatona S-transferase, IL: interleucina, iNOS: óxido nítrico sintase induzível, Keap1: proteína 1 associada à ECH semelhante a Kelch, MDA: malondialdeído, mTORc: alvo mamífero da rapamicina, NF- κ B: fator nuclear- κ B, NO: óxido nítrico, Nrf2: fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2, ROS: espécies reativas de oxigênio, RTKs: receptor de tirosina quinase, SOD: superóxido dismutase, TNF- α : fator de necrose tumoral- α .

1.4.2 Receptor de Insulina (IR) e GSK3 na DA

Em condições normais, a ligação da insulina à subunidade extracelular do receptor (tirosina quinase) IR leva à ativação da subunidade intracelular β e sua autofosforilação. Uma vez ativado, o IR fosforila diversos substratos intracelulares, incluindo uma família de proteínas conhecida como substrato para IR (IRS), então a fosforilação de alvos intracelulares leva ao recrutamento e ativação de diversas proteínas e a iniciação de muitas cascatas de sinalização, dentre as quais as mais importantes são a via da fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) e a cascata da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (JOHNSTON; PIROLA; VAN OBERGHEN, 2003). A ativação da via PI3K induz a ativação da serina treonina quinase Akt

ou Protein kinase B (PKB), promovendo sobrevivência neuronal ao inativar as vias pró-apoptóticas (VAN DER HEIDE; RAMAKERS; SMIDT, 2006).

A Akt medeia a fosforilação ou inativação do glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β) na cascata da glicólise e na geração de energia. Uma vez que a sinalização intracelular para a insulina se encontra prejudicada, resulta em aumento da GSK3 β , o que estimula a formação de emaranhados neurofibrilares pela a hiperfosforilação da proteína TAU nos neurônios (DA SILVEIRA et al., 2021). Além disso, a sinalização de insulina via ativação de PI3K também regula a liberação do APP no espaço extracelular e a produção de A β (PHIEL et al., 2003)

1.5 Alterações histopatológicas na DA

Macroscopicamente se observa uma notável atrofia no hipocampo e em diversas áreas do neocórtex, particularmente nos lóbulos frontal e temporal (BLENNOW *et al.*, 2006). Já microscopicamente, os principais marcadores patológicos são as placas senis, os emaranhados neurofibrilares intracelulares e outras lesões neurofibrilares formadas pela proteína tau hiperfosforilada, constituindo os filamentos pareados helicoidais (PHF-tau), ativação microglial e astrócitária e perda neuronal e sináptica (NIMMRICH; EBERT, 2009).

O estresse oxidativo e a inflamação no início da DA desencadeiam uma cascata de alterações bioquímicas e estruturais com disfunção mitocondrial, astrogliose e microgliose. Em conjunto, podem levar a uma cascata de morte com formação de radicais livres, liberação de mediadores inflamatórios, hiperfosforilação da proteína Tau e agregados de peptídeo A β resultando em um ciclo neurodegenerativo que leva à morte celular (DESHMUKH et al., 2009; MEHAN et al., 2011).

Estas alterações patológicas se encontram principalmente no córtex cerebral (hipocampo e neocórtex), mas também se observam em estruturas subcorticais como a amígdala, os núcleos basais, o tálamo anterior, o locus cerúleos e os núcleos da rafe (JUCKER *et al.*, 2006). O hipocampo e as estruturas temporais medianas adjacentes são afetados precocemente pelas alterações patológicas da DA, assim como os neurônios colinérgicos do cérebro anterior basal (COYLE *et al.*, 1983; HENDERSON, 2014).

1.6 Sintomatologia da DA

Indivíduos com DA podem manifestar sintomas variados, mas apresentam significativas alterações e/ou prejuízos leves a moderados em múltiplas funções cognitivas,

funcionais e domínios comportamentais (ATRI, 2019). O dano neuronal ocorre inicialmente em partes do cérebro envolvidas na memória, incluindo o hipocampo, posteriormente, afeta áreas do córtex cerebral, como as responsáveis pela linguagem, raciocínio e comportamento social e muitas outras áreas do cérebro são danificadas (NIA, 2021). Estudos já sugerem que as complexas mudanças cerebrais associadas a DA, como a formação de placas amilóides ou de emaranhados da proteína tau, começam uma década ou mais antes do aparecimento de problemas de memória e raciocínio (NIA, 2022).

Os sintomas da DA são irreversíveis e incluem: perda de memória; desafios no planejamento ou resolução de problemas; dificuldade em concluir tarefas rotineiras; confusão com relação ao tempo/espaço; dificuldade em compreender imagens visuais e relações espaciais; desordem verbal e escrita; apraxia; agnosia; julgamento diminuído ou deficiente; isolamento social e mudanças de humor, personalidade e comportamento (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2022). Ainda, sintomas comportamentais e psicológicos da DA incluem agitação, comportamento motor aberrante, ansiedade, depressão e alucinações. É estimado que estes sintomas acometem cerca de 90% dos pacientes com demência, os quais afetam dramaticamente a qualidade de vida de pacientes com DA e seus cuidadores (CEREJEIRA *et al.*, 2012).

Pode haver grande heterogeneidade no desenvolvimento e progressão dos sintomas e no declínio clínico de indivíduos com DA (ATRI, 2019), mas ela pode ser dividida em 3 fases: leve, moderada e severa. Na fase leve, onde normalmente ocorre o diagnóstico, o indivíduo tem cada vez mais dificuldade em entender o mundo ao seu redor e se desenvolve a percepção gradativa de que algo está errado. Na fase moderada da doença com a intensificação dos sintomas, torna-se necessária uma supervisão e cuidados mais intensivos. Já na fase grave, o indivíduo se torna completamente dependente de seus cuidadores (NIA, 2022b).

1.6.1 Memória e DA

Conceitualmente, a memória pode ser classificada em memória “declarativa” e “não declarativa” (implícita ou de procedimento ou procedural). A memória declarativa ou memória explícita (de “o que”) está relacionada a experiências próprias, reconhecimento de cenas e de objetos familiares e envolve a recuperação consciente de eventos ou fatos ocorridos. Esse tipo de memória inclui a memória episódica, que se refere a informações que estão relacionadas a um lugar e tempo específicos, assim como a memória semântica que se refere a um conhecimento geral não ligado a contexto espacial ou temporal em particular (KINTSCH,

1995). Estudos farmacológicos e clínicos têm mostrado que a memória explícita ou declarativa é processada por estruturas no lobo temporal e suas conexões (ERIKSSON, 2002).

A memória não declarativa (de “como fazer”) refere-se a várias formas de memória que não estão diretamente acessíveis à consciência, tais como: as habilidades e hábitos de aprendizagem, o condicionamento clássico, o “priming” ou pré-ativação (habilidade de detectar ou identificar um estímulo como um resultado de uma exposição prévia) (ERIKSSON, 2002). Acredita-se que a memória implícita ou de procedimento seja processada pelo núcleo estriado e/ou diencéfalo (IZQUIERDO, 1993c)

Os tipos de memórias podem ser classificados quanto ao seu tempo de retenção (ou duração) em: memórias de longa duração, memórias de curta duração e memórias de trabalho (working memory) (GOLD; McGAUGH, 1975; LENT, 2001). A memória de trabalho ou operacional é muito breve e fugaz e serve para o armazenamento temporário (segundos ou poucos minutos) de informações que serão úteis apenas para o raciocínio imediato e resolução de problemas, podendo ser descartadas (esquecidas) logo a seguir (IZQUIERDO; MEDINA, 1991). A memória de curta duração dura minutos ou horas e servem para proporcionar a continuidade do nosso sentido do presente e engloba o tempo durante o qual a memória de eventos em curso está sendo consolidada e convertida à memória de longo prazo (DUDAI, 2004). Durante este tempo, a memória a curto prazo é vulnerável e sujeita a desaparecer, ao passo que as memórias de longa duração são mais resistentes (SQUIRE; ZOLA, 1996).

As memórias de longa duração não são tão lábeis, mas precisam de um tempo maior para serem codificadas na rede neural, estimado por no mínimo 6 até 12 horas. Existem muitas evidências na literatura de que os diferentes tipos de memória são organizados e controlados por sistemas neuroanatômicos distintos e estas categorias de memória não são excludentes, quando um organismo aprende alguma coisa importante, vários destes sistemas de memória podem ser empregados (PREDIGER, 2005).

O processo de consolidação que converte memórias de curto prazo em memórias de longo prazo consiste na alteração da atividade dos circuitos envolvidos através de plasticidade neural. Os mecanismos propostos para esse fenômeno que suportam a formação de memórias são a potenciação de longa duração (LTP, do inglês “long-term potentiation”) e a depressão de longa duração (LTD, do inglês “long-term depression”) (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; IZQUIERDO; McGAUGH, 2000). Os mecanismos moleculares relacionados aos processos de aprendizagem e memória envolvem, inicialmente, a ativação de receptores glutamatérgicos, entrada de Ca^{2+} , ativação de proteínas como CaMKII, PKC e a proteínas quinases. A consolidação permite que a informação lábil sensível nas perturbações

seja fixada e estabilizada na rede neural e envolve vários mecanismos como a transcrição de genes ou a síntese de novas moléculas (ALKON *et al.*, 2005). As memórias remotas, uma vez consolidadas, se distribuem difusamente pelo córtex cerebral e a perda de memórias declarativas acontece quando ocorrem lesões corticais extensas, como ocorre na DA.

De modo geral, a memória possui quatro componentes essenciais: um componente neocortical não frontal, que modula a percepção na realização dos testes de memórias implícitas; um componente dos gânglios da base, que interfere nos testes de memórias procedurais sensório-motoras; um componente temporal medial/hipocampal, que media a aquisição, retenção e evocação de memórias explícitas e um componente do lobo frontal que controla as memórias operacionais ou de trabalho (MOSCOVITCH, 1992).

1.7 Diagnóstico da DA

No sistema público de saúde brasileiro, na atenção primária, o diagnóstico clínico é baseado na avaliação minuciosa, especialmente dos domínios cognitivos afetados e do comprometimento funcional dos pacientes através de anamnese e exame clínico, avaliação neuropsicológica, exames laboratoriais e neuroimagem estrutural (como tomografia de crânio ou ressonância magnética). Na atenção secundária, inclui-se pesquisa de biomarcadores e na terciária, adiciona-se exames de neuroimagem funcional, como o PET-FDG ou a tomografia por emissão de fóton único (SPECT) (STURCHIO *et al.*, 2022).

Os comprometimentos cognitivos ou comportamentais devem afetar no mínimo dois dos seguintes campos: memória, funções executivas, habilidades visoespaciais, linguagem, personalidade ou comportamento (GALLUCCI; TAMELINI; FORLENZA, 2005). Exames de imagem e testes genéticos, apesar de pouco usuais, podem auxiliar no diagnóstico de DA, já a tomografia computadorizada (TC), a ressonância magnética (RM) e a tomografia por emissão de pósitrons (PET) são os mais utilizados. Dentre os PET usados no diagnóstico de DA, destacam-se os que medem níveis de A β , acúmulo anormal da proteína Tau e da fluordesoxiglicose, um análogo da glicose. Estudos mostram que pessoas com demência geralmente apresentam padrões anormais de diminuição do uso de glicose em áreas específicas do cérebro (NIA, 2022).

Os exames laboratoriais consistem normalmente em avaliação hematológica, renal, hepática, perfil lipídico e metabólico (sódio, potássio e cálcio séricos), glicemia de jejum, vitamina B12, TSH, T4 livre, VDRL e são usados principalmente para causas secundárias de declínio cognitivo como hipotireoidismo, hipovitaminoses e neurosífilis. Procura-se identificar

também doenças sistêmicas e comorbidades que possam contribuir para o agravamento do quadro neurológico, como dislipidemia e diabetes (SMID *et al.*, 2022).

Além disso, biomarcadores no líquido cefalorraquidiano (LCR) também podem ser utilizados para fins de diagnóstico, tais como o peptídeo A β de 42 aminoácidos (A β 1-42) e a proteína tau em sua composição total e porção fosforilada no resíduo de 181 de treonina (T-tau e P-tau, respectivamente). Na DA, há redução da concentração de A β 1-42 e aumento das concentrações de T-tau e P-tau (SMID *et al.*, 2022). No entanto, os procedimentos de análise do LCR, e os exames de imagem são ou invasivos, ou caros, e de difícil acesso a grande parte da população.

As lesões se iniciam, com grande probabilidade, várias décadas antes dos pacientes manifestarem os primeiros sintomas clínicos, por isso o diagnóstico atual é tardio, já que a doença se confirma quando o dano cerebral já é muito evidente e irreversível. Portanto, quanto mais cedo a doença for diagnosticada, maior a chance do tratamento ser bem-sucedido e do paciente ter uma vida mais longa e com mais qualidade (MATTSON; MAGNUS, 2006).

Biomarcadores específicos de doença, facilmente acessíveis, seriam de imenso valor para um diagnóstico diferencial entre os subtipos de demência. Um estudo de revisão sistemática buscou identificar biomarcadores no sangue que poderiam ajudar a diferenciar DA de Degeneração Lobar Frontotemporal (DLFT), incluindo Demência Frontotemporal (DFT), ou DA de Demência com Corpos de Lewy (DCL). Em relação aos biomarcadores para DA versus DLFT, foi encontrada uma excelente acuidade diagnóstica para a p-tau181, a p-tau217, a sinaptofisina (SYN), a sinaptopodina, o GAP43, a calmodulina, os microRNAs miR-107/miR-335-5p e miR-127-3p, a neurogranina, a sinaptotagmina e o GFAP. Para a distinção de DA versus DCL, apresentaram boa acuidade os miR-21-5p e miR-451a (SANTOS *et al.*, 2022). Estes biomarcadores sanguíneos podem, potencialmente, vir a desempenhar um papel importante no diagnóstico de demências neurodegenerativas, mas ainda é necessária mais investigação com estudos longitudinais e coortes maiores para validar o valor clínico destes biomarcadores derivados do sangue.

1.8 Diabetes tipo 3 e DA

A etiologia da DA ainda não está totalmente elucidada, mas sabe-se que múltiplos fatores ambientais e genéticos estão envolvidos como: idade, sexo, histórico familiar (formas genéticas raras de início precoce da doença), traumatismo craniano, diabetes, hipertensão,

obesidade, tabagismo, depressão, hiperlipidemia, baixa atividade física e cognitiva, hábitos de vida e medicamentos (SCHIPPER, 2011).

A Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) e a Doença de Alzheimer (DA) compartilham muitas características, incluindo inflamação crônica, estresse oxidativo, sinalização de insulina prejudicada, resistência à insulina, intolerância à glicose e comprometimento cognitivo (CHATTERJEE S e MUDHER A, 2018; LI R, et al., 2019). Essa associação clínica levou à hipótese de que moléculas pró-inflamatórias derivadas da periferia também poderiam influenciar na patogênese no Sistema Nervoso Central (SNC).

Na DMT2, a hiperglicemia crônica promove a liberação de mediadores inflamatórios e glicosilação proteica, com auto-oxidação das partículas de glicose, desencadeando a formação de radicais livres e disfunção celular (GOMES; ACCARDO, 2019). Conseqüentemente, há uma importante mudança sistêmica, que não é compensada totalmente pelo sistema antioxidante fisiológico normal. Os mediadores inflamatórios periféricos atravessam a barreira hematoencefálica e em conjunto com mediadores produzidos pela gliose e pelos adipócitos periféricos ativados, desencadeiam a inflamação do SNC (NAZARETH, 2017), contribuindo para resistência à insulina neuronal e os marcadores neuronais na DA (DA SILVEIRA et al., 2021).

A resistência à insulina é uma condição patológica em que os tecidos-alvo não respondem à concentração plasmática ideal de insulina (GUO; TABRIZCHI, 2006), ou seja, ocorre uma interrupção da sinalização intracelular da insulina, prejudicando a função do receptor de insulina (IR) (PIPATPIBOON *et al.*, 2012). Os receptores de insulina (IRs) no cérebro estão amplamente expressos em neurônios em comparação com a glia e concentrados nas regiões de sinapse neuronais, onde desempenham diversas funções, incluindo regulação homeostática, modulação da plasticidade sináptica, neurotransmissão e neurodegeneração relacionada à idade (CHATTERJEE; MUDHER, 2018). Essa forma de resistência à insulina no cérebro associada à DA corrobora com a hipótese de que a DA se trata de uma nova forma de diabetes, chamada de Diabetes Tipo 3 (DE LA MONTE, 2009).

Além disso, análises *post mortem* e em modelos animais de DA apontam baixos níveis cerebrais de insulina e fosforilação do receptor de insulina subtipo 1 (IR-1) (LESTER-COLL *et al.*, 2006). Também foi apontado uma associação entre a resistência à insulina, atrofia cerebral e déficits de memória em idosos com 60 anos de idade (WILLETTE *et al.*, 2013; CRANE *et al.*, 2013). Evidências também tem demonstrado que a DA avançada estaria associada a níveis cerebrais reduzidos de insulina, do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e dos genes IR (WATSON; CRAFT, 2003).

Esta resistência à insulina periférica e neuronal pode ser causada pelo consumo prolongado de dieta rica em gordura prejudicando a função mitocondrial pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) no cérebro, levando à diminuição da função cognitiva (CRAFT; WATSON, 2004; PIPATPIBOON *et al.*, 2012 e 2013).

Curiosamente, existem muitas evidências na literatura mostrando uma correlação entre os padrões alimentares e a incidência de DA, indicando a dieta como um fator de risco modificável. Deste modo, as diretrizes do Instituto Nacional do Envelhecimento Associado ao Alzheimer para a doença de Alzheimer (DA) e para o declínio cognitivo relacionado à DA introduziu algumas evidências que sugerem uma relação direta entre dieta e mudanças na estrutura e atividade cerebral (RAVI *et al.*, 2018).

Estudos têm evidenciado que existe uma real associação entre mudanças no estilo de vida, como dieta e componentes dietéticos e a ocorrência de DA (VASSALLO, 2015). Solfrizzi e colaboradores mostraram que outros padrões alimentares emergentes, como a Abordagem dietética para parar a hipertensão (Dietary Approach to Stop Hypertension - DASH) e a Intervenção da dieta mediterrânea DASH para atraso neurodegenerativo (Mediterranean-DASH diet Intervention for Neurodegenerative Delay - MIND) foram sugeridos como possíveis dietas anti-DA, pois apresentaram taxas mais lentas de declínio cognitivo e redução significativa da taxa de DA (SOLFRIZZI *et al.*, 2017). Outros estudos têm evidenciado que existe uma forte correlação entre má nutrição e DA (POLIDORI, 2014) e que o consumo de suplementos dietéticos e nutracêuticos pode ser uma via terapêutica eficaz para o tratamento da DA (TOUPSE *et al.*, 2022).

Apesar da insulina ser produzida em grande parte pelas células β pancreáticas e atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), ela pode ser também produzida localmente em algumas regiões do cérebro como hipocampo, córtex pré-frontal, córtex entorrinal e bulbo olfatório (HOYER, 2003). Além disso, os Receptores de Insulina (IR's) estão abundantemente presentes no cérebro e são encontrados em maior concentração no bulbo olfatório, hipotálamo, córtex cerebral, cerebelo e hipocampo (SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2006; DE FELICE; LOURENCO; FERREIRA, 2014).

Tanto estudos *in vitro* como *in vivo* têm mostrado que a maior parte da glicose consumida pelo cérebro é utilizada para manutenção dos gradientes iônicos pré e pós-sinápticos, responsáveis pelas neurotransmissões excitatórias e para manutenção do potencial de repouso dos neurônios (ATTWELL; IADECOLA, 2002; SHULMAN *et al.*, 2004).

Toda a glicose necessária para o funcionamento cerebral é transferida através das membranas celulares e barreiras por duas classes de transportadores específicos e saturáveis, os

transportadores de glicose independentes de sódio (GLUT) e transportadores de glicose dependentes de sódio (SGLT) (SHAH *et al.*, 2012). Entretanto, o GLUT3 é considerado como o principal transportador de glicose cerebral (DUELLI; KUSCHINSKY, 2001).

Uma importante consequência fisiopatológica do metabolismo alterado da glicose, gerada pela resistência à insulina, é a redução de aproximadamente 50% da produção de ATP no início da DAE e esta redução continua aumentando com a progressão da doença (SHAH; DESILVA; ABBRUSCATO, 2012). A sinalização da insulina é mediada por duas vias de transdução: a via da quinase fosfatidil-inositol 3 (PI3 quinase) e a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAP quinase), que controlam a captação de glicose pelas células (JOHN *et al.*, 2003). Os mecanismos neuropatogênicos envolvidos tanto na resistência à insulina periférica do diabetes tipo 2, como na sinalização da insulina no cérebro de pacientes com DAE, tem mostrado semelhanças no processo de formação do peptídeo A β (DE FELICE; LOURENCO; FERREIRA, 2014) e análises em indivíduos com DA mostraram que sinais de captação de glicose cerebral estão diminuídos, independente de atrofia estrutural, e podem ser detectáveis até três décadas antes do início esperado dos sintomas clínicos da DAE (MOSCONI *et al.*, 2006).

1.9 Modelos experimentais da DA

Os estudos experimentais têm aberto novos horizontes para o estudo de diversas patologias e o camundongo tem sido muito escolhido em pesquisas não clínicas pelo pequeno porte, facilidade de obtenção e manutenção. Também as técnicas de química computacional e bioinformática permitem uma análise mais criteriosa do alvo terapêutico a ser estudado (FIOCRUZ, 2017).

Nesse contexto, o uso de metodologias computacionais tem se tornado cada vez mais importantes, pois essa aplicação tem oferecido um excelente suporte para o desenvolvimento e identificação de novos fármacos que envolvam a busca de alvos bioquímicos relacionados com a etiopatogenia da doença. Além disso, faz-se necessário mimetizar a DA por meio de modelos experimentais que facilitam a análise do início e do progresso da doença, assim como a formulação de novo fármacos para prevenção e tratamento.

A maioria dos modelos transgênicos e duplos transgênicos representam a forma genética e menos prevalente da doença, onde são associadas mutações dos genes que codificam a APP, BACE1, Presenilina 1 e 2 (GOATE, 2006; MUCKE *et al.*, 2000). Já os modelos triplos transgênicos (3xTgAD) conseguem reproduzir melhor os marcadores moleculares e

histológicos da DA, além de expressar genes codificadores da proteína APP, da Presenilina-AP1, o genoma destes camundongos apresenta também gene humano mutado da proteína Tau (ODDO *et al.*, 2003).

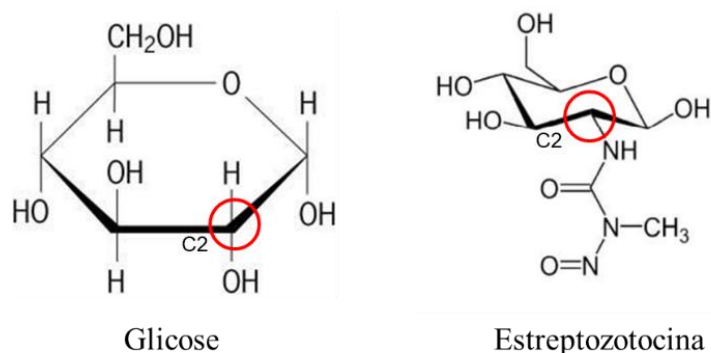
A utilização dos animais transgênicos para pesquisar a DA possui a vantagem de conseguir reproduzir características neuropatológicas, cognitivas e comportamentais semelhantes à doença. Com isso é possível intervir com tratamentos antes do início das patologias. Porém estes modelos em geral não apresentam perda neuronal, o que o torna inadequado para estudar mecanismos de neuroproteção. Também não são os mais adequados para estudar a forma mais comum de DA que é a esporádica, onde as lesões geralmente não são causadas por mutações (FRANCO; CEDAZO-MINGUEZ, 2013). Também ainda não existem modelos transgênicos para estudo da DA pela hipótese da Diabetes Tipo 3.

Neste sentido, existem modelos não transgênicos, os quais visam mimetizar algumas características neuroquímicas e comportamentais apresentadas na DAE, através de alterações moleculares e sintomas similares a DAE, sendo eles a infusão intracerebroventricular (icv) direta do peptídeo A β (SARACENO *et al.*, 2013), a destruição neurotóxica do núcleo basal e suas eferências colinérgicas corticais (SWAROWSKY *et al.*, 2008), oclusão permanente e bilateral das carótidas comuns, causando uma hipoperfusão cerebral crônica (VICENTE *et al.*, 2009) e o modelo por injeção icv de estreptozotocina (STZ), onde o déficit cognitivo é frequentemente anterior à formação de placas, facilitando o estudo da DAE na sua fase inicial (WU *et al.*, 2014; LANNERT; HOYER, 1998; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2006). Tem sido evidenciado que a neurotoxicidade exercida pelo acúmulo das formas oligoméricas fibrilares intracelulares do peptídeo A β , resultam em uma maior falha sináptica e dano neuronal, contribuindo para a neurodegeneração progressiva na DAE (VILLEMAGNE *et al.*, 2017).

1.10 Modelo de DAE por estreptozotocina (STZ)

A estreptozotocina (STZ) (Figura 5) é um composto, glicosamina-nitrosouréia natural, produzido pela bactéria Gram-positiva *Streptomyces acromogenes* (EILEEN DOLAN, 1997), possui estrutura química muito semelhante à glicose, possuindo como diferença apenas uma única substituição da hidroxila em C2 por um grupo nitrosuréia, esta semelhança torna possível que a droga seja carregada para dentro da célula através do transportador de glicose GLUT 2 (LELOUP *et al.*, 1994).

Figura 5 - Comparação das estruturas moleculares da glicose e da estreptozotocina (STZ)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os trabalhos de Junod e colaboradores em 1969 demonstraram que uma única administração intraperitoneal (i.p) de estreptozotocina (STZ) em ratos Wistar causava aumento sérico da glicose (JUNOD *et al.*, 1969). Em 2002, Degenhardt e colaboradores padronizaram o modelo de Diabetes Tipo 1 com a dose de 40-60 mg/kg de STZ (DEGENHARDT *et al.*, 2002).

A STZ no modelo de Diabetes causa lesão nas células β -pancreáticas (produtoras de insulina) via o transportador de glicose tipo 2 (GLUT2) e levando a uma alquilação do DNA. Isso ativa o mecanismo de reparo da enzima nuclear poli-ADP-ribose polimerase (PARP), resultando na depleção do NAD⁺ e consequente depleção dos estoques de ATP e necrose celular (LENZEN, 2008). Além do efeito tóxico nas células β -pancreáticas, o STZ também interage em outras células que expressam GLUT2 e do transportador de glicose dependente de insulina 4 (GLUT 4) (LENZEN, 2008; GRIEB, 2016). Em condições fisiológicas, a insulina ativa a via PI3K-Akt, a Akt quinase ativada fosforila o AS160, que recruta GLUT para a membrana plasmática, permitindo que a glicose entre com eficiência na célula (GABBOUJ *et al.*, 2019).

No cérebro, as células endoteliais e os astrócitos, componentes da barreira hematoencefálica, expressam principalmente GLUT1, enquanto o transportador de glicose mais comum nos neurônios é o GLUT3. Ambos, GLUT1 e GLUT3, são independentes de insulina. No entanto, foi demonstrado que o GLUT4 dependente de insulina é expresso em certa medida em várias regiões do cérebro, como hipocampo, cerebelo e bulbo olfativo (GABBOUJ *et al.*, 2019).

Embora se ache que a administração i.p de STZ não passe pela barreira hematoencefálica (BHE), em 2014 foi evidenciado que ratos diabéticos por STZ apresentaram déficits de memória (WANG *et al.*, 2014), corroborando com os estudos sobre a interação do metabolismo da glicose e a cognição (LANNERT; HOYER, 1998) e de estudos *pós-mortem*

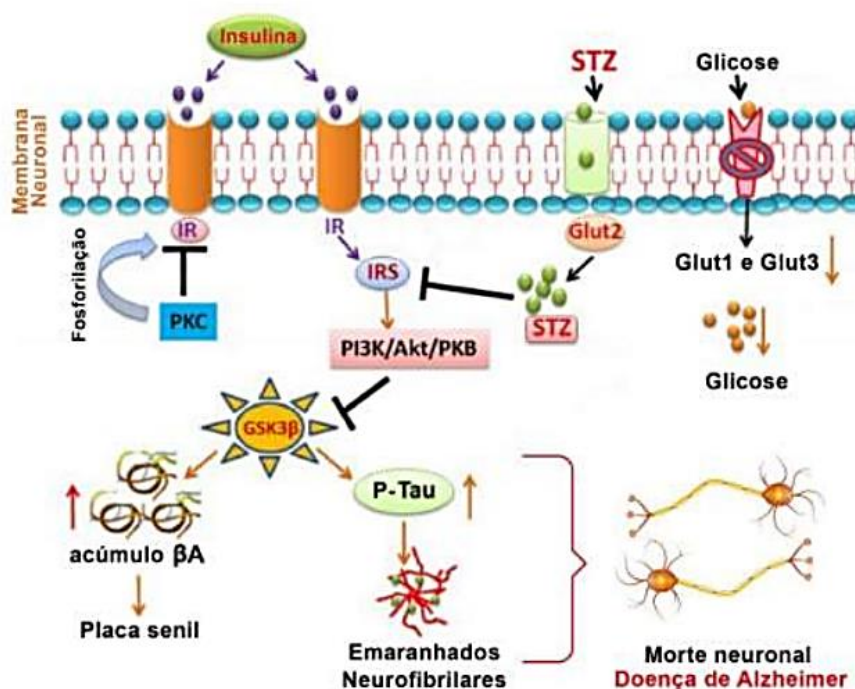
que evidenciam a resistência à insulina e sua correlação com a severidade da DA no cérebro de pacientes (DE LA MONTE; WANDS, 2005; STEEN *et al.*, 2005; HOYER *et al.*, 2014). Além disso, o receptor GLUT 2 está localizado em áreas específicas do encéfalo, em particular no hipotálamo e tronco cerebral, onde é encontrado em neurônios, astrócitos, tanícitos e células epiteliais que revestem os ventrículos cerebrais (THORENS, 2011; LANFRAY *et al.*, 2013).

O modelo de infusão intracérebroventricular (i.c.v) tem sido proposto como um modelo não transgênico da DAE em doses sub-diabetogênica de 1-3 mg/kg, pois induz a sintomatologia de déficits cognitivos (LANNERT; HOYER, 1998; SALKOVIC-PETRISIC; HOYER; LANNERT, 2007), o comprometimento da sinalização colinérgica (BLOKLAND; JOLLES, 1994), estresse oxidativo (SAXENA *et al.*, 2011), redução do metabolismo cerebral da glicose (HOYER; LANNERT, 2007) e a resistência à insulina cerebral (AGRAWAL, 2011). Contudo, foi observado que a presença de marcadores da DA, como A β , placas senis e tau fosforilada aparecem a longo prazo da progressão da lesão, não havendo comprometimento sistêmico (LESTER-COLL *et al.*, 2006).

Esse modelo evidenciou o aumento da fosforilação (inativação) de GSK3- β , que leva a formação de tau-fosforilada e acúmulo de placas senis (SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2006) (Figura 6). Além disso, o comprometimento do aprendizado e memória também é progressivo e de longo prazo, onde após 14 dias da infusão se pode avaliar uma redução da memória em esQUIVA inibitória, mas não na memória espacial (Water Maze).

A GSK3- β está relacionada com a uma via que tende a corroborar com o mecanismo de formação da resistência à insulina na Diabetes Mellitus e Diabetes Tipo 3 (HOYER *et al.*, 2004; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2006), pois a insulina aumenta a atividade da via Akt/PKB, inibindo GSK3- β , regulando negativamente a fosforilação de seus substratos, tais como a proteína Tau (BHAT; BUDD; AVILARATAN, 2004), levando à neurodegeneração pela falta de responsividade ao fator neurotrófico (insulina), formação de EROS, deficiência no metabolismo energético e fosforilação do receptor de insulina (DE LA MONTE, 2009) (Figura 6).

Figura 6 - Neurotoxicidade celular causada pela estreptozotocina (STZ)



Fonte: Adaptado de Kamat *et al.*, 2015. O STZ entra na célula via transportador de glicose tipo 2 (GLUT2), seu efeito no receptor de insulina (IR), causando inibição da sinalização do IR e comprometimento da via PI3K/Akt. Essa inibição de PI3K e Akt também inibe a regulação da GSK-3 β , com o aumento da sua atividade resultando nas características da DA, tais como: a acumulação de A β (que leva a formação de placas senis) e a hiperfosforilação da Tau (que promove a formação de emaranhados neurofibrilares). Por outro lado, as proteínas quinases B/C também inibem o RI pela sua hiperfosforilação e dificultam a função normal da insulina nos neurônios. A STZ também reduz a expressão dos transportadores de glicose GLUT 1 e 3, prejudicando a entrada de glicose na célula.

Resumidamente, a insulina se liga ao IR (receptor do tipo tirosina quinase), tanto central como periférico, que recruta seu substrato no sítio de ancoramento, tornando-o fosforilado nos resíduos de tirosina. Este torna-se capaz de recrutar várias moléculas sinalizadoras, dentre estas a enzima fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K) (THORENS, 2011). A PI3K fosforila o fosfoinosítídeo da membrana que ancora a proteína cinase B (PKB), a qual promove a translocação do receptor de glicose GLUT 4 para a membrana plasmática, promovendo maior aporte de glicose nos tecidos dependentes de insulina. Por outro lado, a PKB também modula por fosforilação a atividade da enzima glicogênio sintase cinase 3 (GSK 3), que, dependendo da sua isoforma, regula os peptídeos A β e a fosforilação da proteína Tau (SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2006). As formas citosólicas da enzima GSK3 podem ser: a GSK-3 α e a GSK-3 β (SALKOVIC-PETRISIC; TRIBL; HOYER, 2006; CORREIA *et al.*, 2011). Sendo que a GSK-3 β regula a fosforilação da proteína Tau (CHENG *et al.*, 2005) e a GSK-3 α está associada com a formação do peptídeo A β (PHIEL *et al.*, 2004) (Figura 6).

Assim, este modelo experimental é o mais amplamente aceito pela literatura (DUBEY *et al.*, 2018) e fornece subsídios morfológicos e moleculares para o entendimento da DAE em humanos pela nova hipótese da diabetes tipo 3 por possuir várias das características da doença e por mimetizar a progressiva deterioração cognitiva e do metabolismo energético encefálico (GRIEB, 2016; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013) (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação entre o modelo de DAE induzido pela infusão i.c.v de STZ e a DA humana

PATOLOGIA	MODELO STZ i.c.v.	DOENÇA DE ALZHEIMER (HUMANO)
COMPORTAMENTAL déficit cognitivo	aprendizado e memória	demência
MORFOLOGIA gliose perda sináptica	+ +	+ +
METABÓLICA glicose / energética	metabolismo reduzido	metabolismo reduzido
NEUROQUÍMICA estresse oxidativo transmissão colinérgica sinalização do RI	+ reduzida resistência à insulina no encéfalo	+ reduzida resistência à insulina no encéfalo
MARCADORES DA DOENÇA proteína tau amilóide β	hiperfosforilada angiopatia amilóide	emaranhados neurofibrilares placas de amilóide β

Fonte: Salkovic-Poetriscic; Hoyer (2007).

Até o momento, os estudos utilizando o modelo de DAE por STZ só têm evidenciado a formação de placas $A\beta$ com um mínimo de 3 meses após as injeções de STZ (SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2006). Entretanto, estudos têm demonstrado haver um aumento significativo da expressão da proteína $A\beta$ no hipocampo aos 14 dias após a administração de STZ e este efeito parece diminuir no dia 21 (RAVELLI *et al.*, 2017).

As alterações patológicas no modelo de DAE por STZ, como redução da espessura cortical, aumento na expressão de GFAP (marcador de ativação astrocitária), afinamento do corpo caloso e formação de placas amiloides são dependentes do tempo decorrido desde a injeção da STZ até 1 mês após, sendo considerada uma resposta aguda, entre 1 e 3 meses uma fase compensatória e entre 6 e 9 meses uma fase descompensatória, com uma fase crônica de declínio progressivo (KNEZOVIC *et al.*, 2015). Nesse sentido, o uso do modelo de administração i.c.v de doses sub-diabéticas de STZ pode contribuir para o estudo da DAE e de novos alvos terapêuticos.

1.11 Tratamento da DA

Atualmente não há tratamento curativo para a DA, mas algumas intervenções farmacológicas e não farmacológicas podem contribuir para aliviar os sintomas, retardar a progressão da doença e melhorar a qualidade de vida. As abordagens terapêuticas atuais são baseadas na etiologia, no perfil dos sintomas e no estágio da demência (WORLD ALZHEIMER REPORT, 2022).

O tratamento farmacológico na DA leve, moderada e grave consiste no uso de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChEI), como donepezila, galantamina e rivastigmina para aumentar a disponibilidade de acetilcolina no cérebro (SMALL; BULLOCK, 2011). Na DA moderada a grave é recomendado a combinação de AChEI com memantina, que é um antagonista do receptor NMDA glutamatérgico e contribui para reduzir a neuroexcitotoxicidade. Embora os efeitos sejam modestos, há evidências de melhora dos sintomas cognitivos e comportamentais da doença ou progressão mais lenta da DA, quando comparado ao placebo (XU *et al.*, 2021).

Não há estudos que comprovem a superioridade de um AChEI sobre os demais, mas há especificidades quanto aos mecanismos de ação, frequência e tipos de efeitos adversos. O tratamento deve começar com a dosagem mais baixa (para evitar eventos adversos) e ir aumentando pelo menos a cada quatro semanas para os AChEI e a cada semana para a memantina (CARAMELLI, *et al.*, 2022).

Para o tratamento dos sintomas neuropsiquiátricos na DA, o uso de sertralina ou mirtazapina são indicados como as melhores opções antidepressivas (HE *et al.*, 2021). Um ensaio clínico recente, no entanto, observou uma tendência de aumento da mortalidade com mirtazapina usada para tratar agitação na demência da DA (BANERJEE *et al.*, 2021). Já para os sintomas de agitação e agressividade, o tratamento de primeira linha seriam os antipsicóticos atípicos (DAVIES *et al.*, 2018). Embora alguns estudos sugiram que os canabinoides possam ter efeitos potencialmente positivos em doenças neurodegenerativas, não há evidências atuais para apoiar seu uso clínico na demência (BRUCKI *et al.*, 2021).

Há também tratamentos não farmacológicos para os sintomas cognitivos como: a *Terapia de Estimulação Cognitiva (CST)* que estimula a linguagem, a memória e as funções executivas (AGUIRRE; SPECTOR; ORRELL, 2014); o *Programa de Reabilitação Cognitiva Multicomponente/Multidisciplinar (MCRP)* que inclui reabilitação e estimulação cognitiva e terapia assistida por computador, treinamento físico, fisioterapia, leitura e jogos (STONER *et al.*, 2021) e a *Orientação para a realidade* com estimulação neurosensorial para reorientar as

atividades diárias, podendo melhorar a cognição e a adesão ao tratamento farmacológico na demência da DA leve a moderada (CARRION *et al.*, 2018).

Outras terapias não farmacológicas também são recomendadas para melhorar os sintomas depressivos, humor, cognição e bem-estar, tais como: musicoterapia (MOREIRA; JUSTI; MOREIRA, 2018), dança (YORK HEALTH ECONOMICS CONSORTIUM, 2017), acupuntura (MEYER; O'KEEFE, 2020), exercício físico (MENG; LIN; TZENG, 2020), terapia ocupacional (SMALLFIELD; HECKENLAIBLE, 2017) e fisioterapia (MARQUES *et al.*, 2019). Intervenções precoces direcionadas a fatores de risco modificáveis no estilo de vida (hipertensão arterial, diabetes, obesidade, sedentarismo, alto consumo de álcool, tabagismo, isolamento social), condições clínicas (perda auditiva e depressão) e ingestão deficiente de nutrientes, podem funcionar como medidas de proteção para reduzir o risco de DA (KIVIPELTO *et al.*, 2020; MOREIRA; JUSTI; MOREIRA, 2020).

Dado que os efeitos dos tratamentos disponíveis não são suficientes e que ainda não existem terapias medicamentosas específicas aprovadas até o momento, a prevenção da demência é primordial, onde mudanças no estilo de vida e intervenções clínicas podem prevenir o aparecimento dos vários fatores de risco já identificados. Por exemplo, o controle adequado da hipertensão e diabetes, atividade física regular, dietas específicas, atividades de estimulação cognitiva devem ser recomendados para mitigar os impactos pessoais, socioeconômicos e de saúde pública da DA (KIVIPELTO *et al.*, 2020).

1.12 Flavonoides

Até o momento, evidências experimentais sugerem que a ingestão de flavonoides como suplementos dietéticos representa uma abordagem promissora para a prevenção e tratamento de condições patológicas caracterizadas por neuroinflamação e neurodegeneração (MAGNI *et al.*, 2022). É conhecido que os flavonoides e seus metabólitos são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (KALT *et al.*, 2008; ANDRES-LACUEVA *et al.*, 2005) e podem exercer ações neurofarmacológicas a nível molecular, influenciando vias de sinalização e expressão gênica (WILLIAMS *et al.*, 2004; SPENCER, 2008).

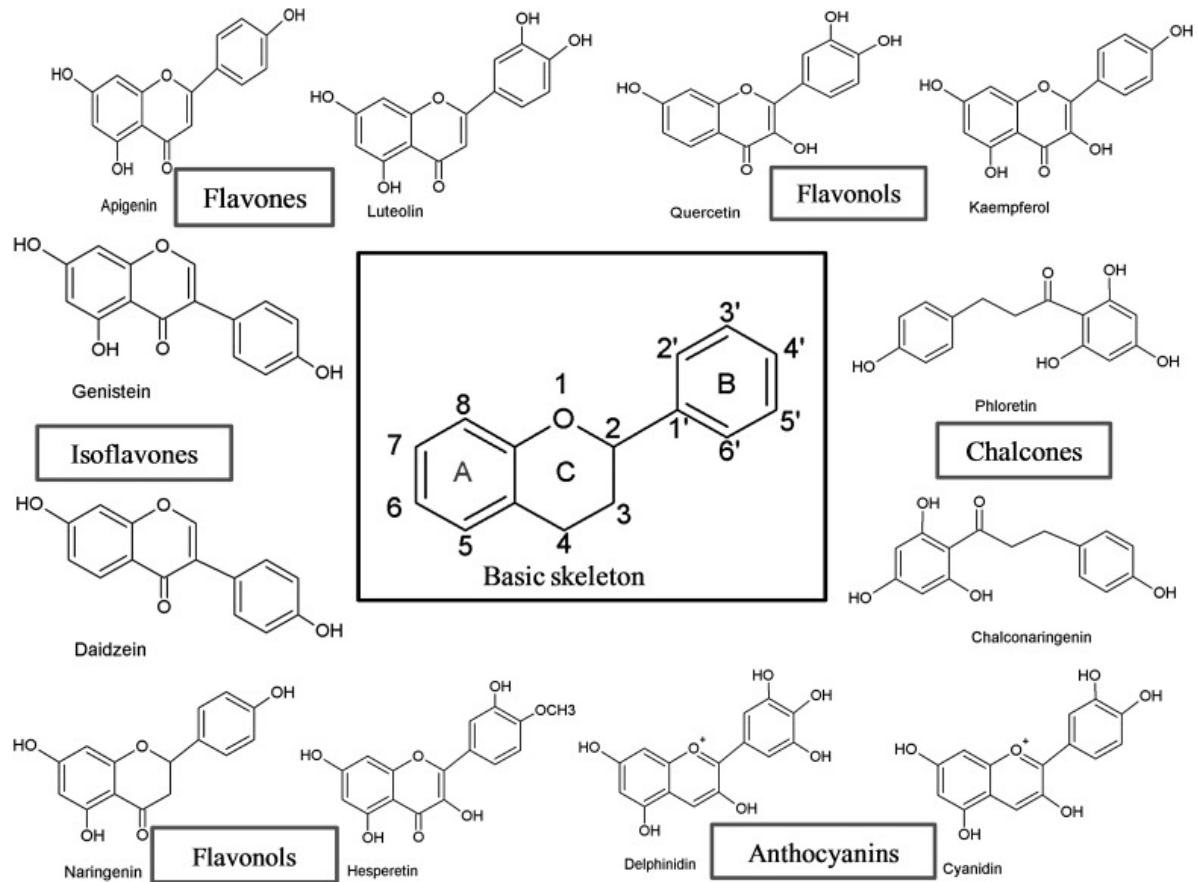
Os flavonoides estão incluídos na família de compostos fenólicos ou polifenóis e compreendem mais de 6000 estruturas diferentes (SAMEC *et al.*, 2021). São metabólitos secundários de plantas e mais abundantes em frutas e sementes, sendo responsáveis por características de cor, fragrância e sabor (DE LUNA; RAMIREZ-GARZA; SALDIVAR, 2020). Sua estrutura química básica é formada por um esqueleto de 15 carbonos, C6-C3-C6,

com dois anéis de benzeno (A e B) ligados por um anel pirano de três carbonos (C) (D'AMELIA, 2018; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016). A presença de grupos hidroxila, insaturações e a posição em que o catecol do anel B liga ao pirano do anel C influenciam a biodisponibilidade, a atividade biológica e o poder antioxidante dos flavonoides (MALEKI; CRESPO; CABANILLAS, 2019; D'AMELIA *et al.*, 2018) (Figura 7).

Essas diferenças estruturais também geram a classificação desses compostos em diferentes classes (KUMAR, PANDEY, 2013). Os flavonoides nos quais o anel B está ligado na posição 3 do anel C são chamados de isoflavonas. Aqueles em que o anel B está ligado na posição 4 são chamados de neoflavonóides, enquanto aqueles em que o anel B está ligado na posição 2 podem ser subdivididos em vários subgrupos com base nas características estruturais do anel C. São eles: flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, flavanóis ou catequinas, antocianinas e chalconas (Figura 7) (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

Praticamente todos os grupos de flavonoides parecem ter alguma atividade antidiabética (AL-ISHAQ *et al.*, 2019). A característica estrutural relacionada a efeitos antidiabéticos consiste na presença de uma ligação dupla C2-C3 (anel C) e grupos hidroxila nas posições C3', C4', C5 e C7 de ambos os anéis A e B. Curiosamente, a substituição na posição C3 de um anel C diminui sua ação anti-inflamatória, porém aumenta sua atividade antidiabética (SHAMSUDIN *et al.*, 2022).

Figura 7 - Esqueletos básicos dos flavonoides



Fonte: Panche; Diwan; Chandra (2016).

Os flavonoides podem modular diversas vias e respostas fisiológicas/patológicas, possuindo, portanto, propriedades anti-inflamatórias (ULLAH *et al.*, 2020) e antioxidantes (SHENet *et al.*, 2022). A insaturação em C2-C3, e a presença dos grupos hidroxila nas posições 3' e 4' do anel B são as características estruturais mais relacionadas com as propriedades anti-inflamatórias dessas moléculas (CHOY *et al.*, 2019). Além disso, os grupos hidroxila funcionais nos flavonoides podem doar elétrons por ressonância para estabilizar os radicais livres e mediar a proteção antioxidante (SAMEC *et al.*, 2021).

Em revisão realizada por Shen e colaboradores (2022), identificou-se oito mecanismos principais relacionados à propriedade antioxidante dos flavonoides, são eles: a eliminação direta de EROs através da doação de átomos de hidrogênio; a ativação de enzimas antioxidantes; a ativação da atividade quelante de metais, reduzindo a toxicidade de íons metálicos redox-ativos; o aumento dos níveis de radicais α -tocoferil (antioxidante que atua no peroxinitrito produzido pela interação de NO e íons superóxido induzida por macrófagos

ativos) reduzindo a oxidação de LDL; inibição de NADPH oxidases, diminuindo a formação de radicais livres; mitigação do estresse oxidativo causado pelo NO; o aumento de níveis de ácido úrico que é um antioxidante intravascular e aumento das propriedades antioxidantes de moléculas antioxidantes de baixo peso molecular (Figura 6).

Por funcionarem como excelentes moduladores de enzimas envolvidas em mecanismos oxidativos, alguns flavonoides são capazes de diminuir marcadores de estresse oxidativo, como glutatona peroxidase, malondialdeído e superóxido dismutase (ULLAH *et al.*, 2020; FARZAEI *et al.*, 2019). Estudos prévios em diferentes tecidos com diversos flavonoides identificaram que esses polifenóis podem atuar na modulação do estresse oxidativo e da inflamação ativando a via Nrf2/Keap1 (RAVULA *et al.*, 2021) e inibindo vias de sinalização GSK3, NF- κ B, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), COX2, ácido araquidônico, fosfolipase A2, prostaglandina E2, lipoxigenase, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), E-selectina, proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) e molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) (AL-KHAYRI *et al.*, 2022; SERAFINI; PELUSO; RAGUZZINI, 2010; SANTANGELO *et al.*, 2007; FAKHRI *et al.*, 2020; REN *et al.*, 2020).

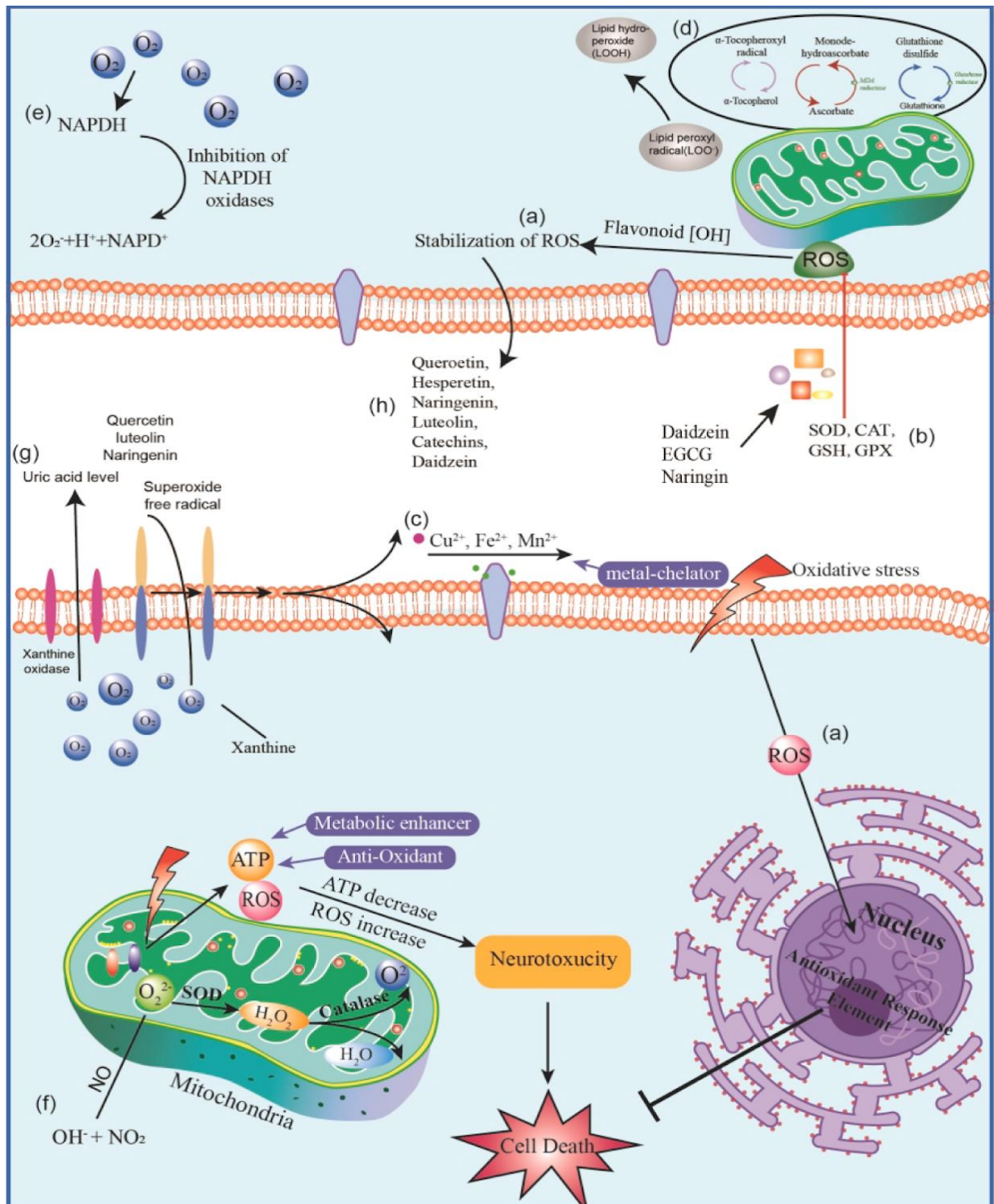
Também foi observado a modulação de MAPK e outras quinases reguladas por sinal extracelular (ERK), fosfoinosítideo-3-quinase (PI3K)/Akt, o que também são mecanismos que reduzem estresse oxidativo e a inflamação (ULLAH *et al.*, 2020). Pode se ainda relatar a ação antioxidante e neuroinflamatória de flavonóides, por exemplo, a hesperitina (IKRAM *et al.*, 2019), a genisteína (AFAQ *et al.*, 2003), a epigallocatequina (LI *et al.*, 2004), a quercetina (CHEN *et al.*, 2005) e a bacaleína (LEE *et al.*, 2003), fisetina (HASSAN *et al.*, 2022) que mostraram atenuar ativação microglial e astrogliar na neuroinflamação por diversos mecanismos de ação.

Desse modo, se tratando de efeitos neuroprotetores, os flavonoides têm se mostrado poderosos agentes contra a neuroinflamação, inibindo a produção de mediadores pró-inflamatórios, elevando a secreção de fatores anti-inflamatórios e modulando a polarização da microglia e astrócitos, principalmente através da inibição de MAPK, da ativação de Nrf2, BDNF/CREB, Wnt/ β -catenina e PI3k/Akt (CHEN *et al.*, 2022) (Figura 8).

Além dessas propriedades anti-inflamatórias (ULLAH *et al.*, 2020) e antioxidantes (SHEN *et al.*, 2022), os flavonoides também apresentam propriedades anticancerígenas, cardioprotetoras, neuroprotetoras, imunomoduladoras e antidiabéticas, estando associados a uma ampla gama de benefícios à saúde (JUCÁ *et al.*, 2020; FRAGA *et al.*, 2019). As principais diferenças nos estudos *in vitro* e *in vivo* são as concentrações fisiológicas dos flavonoides, pois

em estudos *in vitro* a concentração dos compostos é mais alta, enquanto a biodisponibilidade *in vivo* de um composto tem menos impacto na sistêmico (SAJID *et al.*, 2021). Dessa forma, estudos extensivos e em humanos são essenciais para melhorar a biodisponibilidade dos flavonoides e demonstrar sua capacidade como agentes anti-inflamatórios (SAJID *et al.*, 2021).

Figura 8 - Mecanismos de ação *in vitro* dos flavonoides



Fonte: Shenet *et al.* (2022).

Estudos de metanálise envolvendo suplementos contendo flavonoides usados para tratar indivíduos com sobrepeso e obesos com resistência à insulina, verificou-se redução significativa na glicemia de jejum em grupos que receberam suplementação, mostrando que os suplementos contendo flavonoides podem ser eficazes contra resistência à insulina (YAO *et al.*, 2022). Outra revisão sistemática com metanálise avaliou frutos silvestres e verificou um aumento de HDL e redução de LDL em intervenção de 4-6 semanas com cranberry ou arando e redução significativa em níveis de colesterol total e LDL em intervenções com morango liofilizado (WILKEN *et al.*, 2022).

Podemos consumir flavonoides em diferentes concentrações por meio de frutas e vegetais e se beneficiar na prevenção e no tratamento de doenças relacionadas à inflamação (Tabela 2). Em uma pesquisa translacional de longo prazo, pesquisadores do Projeto Memória e Envelhecimento (que iniciou em 1997), adquiriram informações dietéticas completas durante o acompanhamento clínico e autópsias cerebrais de 575 pacientes com DA, cuja média a idade do óbito foi de 91,3 anos (RUSH, 2022). Os dados do estudo sugerem que a antocianina pelargonidina, presente em frutas vermelhas, pode proteger o cérebro envelhecido do desenvolvimento da DA, pois ao longo do tratamento, os pacientes tiveram melhora na memória episódica, memória de trabalho, memória semântica, capacidade visuoespacial e velocidade perceptiva e apresentaram menos neurofilamentos e perda sináptica (RUSH, 2022). De acordo com os autores, isso motiva uma mudança simples que qualquer pessoa pode fazer em sua dieta na busca por saúde, pois mostra que fazer escolhas alimentares específicas pode levar a uma neuroproteção e uma taxa mais lenta de declínio cognitivo.

Tabela 2 - Uso dos flavonoides no tratamento de diversas doenças

Flavonóide	Efeito protetor	Referência
Venalot (troxirrutina 180 mg e cumarina 30 mg)	Reduziu os marcadores inflamatórios sistêmicos em doenças cardiovasculares	PAPAKYRIAKOPOULOU <i>et al.</i> , 2022
Quercetina (500 mg)	Reduziu a rigidez matinal e a dor em mulheres com artrite reumatóide	JAVADI <i>et al.</i> , 2017
Hesperidina (500 mg)	Reduziu os níveis de citocinas próinflamatórias circulantes e melhorou a função endotelial (aumento da dilatação mediada por fluxo, efeito ergogênico)	IMPERATRICE <i>et al.</i> , 2022
Daflon (diosmina 450mg + hesperidina 50mg)	Reduziu a dor, o edema, a congestão e a inflamação. A longo prazo reduziu os sangramentos e secreção da mucosa em pacientes com hemorroidas;	AL-KHAYRI <i>et al.</i> , 2022 e MESHIKHES, 2002
Extrato de chá verde (379 mg)	Melhorou a pressão arterial, a tolerância à insulina, o perfil lipídico, a inflamação e o estresse oxidativo.	ESMAEELPANAH; RAZAVI; HOSSEINZADEH, 2021
Silimarina (Livergol® 420 mg)	Reduziu o inchaço, a dor e a sensibilidade nas articulações em artrite reumatóide	FERRAZ <i>et al.</i> , 2020; SHAVANDI <i>et al.</i> , 2017
Pycnogenol® (220 mg)	Reduziu a proteína C-reativa e a inflamação em pacientes com osteoartrite, melhorando a dor e a rigidez.	FERAGALLI <i>et al.</i> , 2019 e FARID <i>et al.</i> , 2007
Flavopiridol (Diosmina 450mg + Hesperidina 50mg)	Reduziu a carga tumoral na leucemia linfática crônica	AWAN <i>et al.</i> , 2016

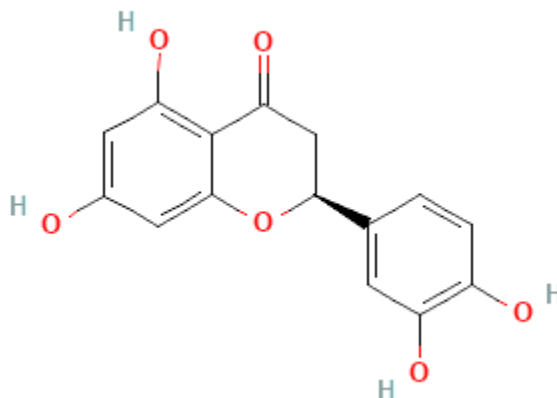
Fonte: Elaborado pelo autor.

1.13 Eriodictiol

Até o momento, evidências experimentais sugerem que a ingestão de flavonóides como suplementos dietéticos representa uma abordagem promissora para a prevenção e tratamento de condições patológicas caracterizadas por neuroinflamação e neurodegeneração (MAGNI *et al.*, 2022).

O eriodictiol (Figura 9) [nome IUPAC: (2S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)- 5,7-dihydroxy-2,3-dihydrochromen-4-one] é uma tetrahidroxiflavanona que é uma flavanona substituída por grupos hidroxil nas posições 5, 7, 3' e 4', respectivamente, e um membro das 3'-hidroxiflavanonas (NCBI, 2022).

Figura 9 - Estrutura química do Eriodictiol



Fonte: NCBI (2022).

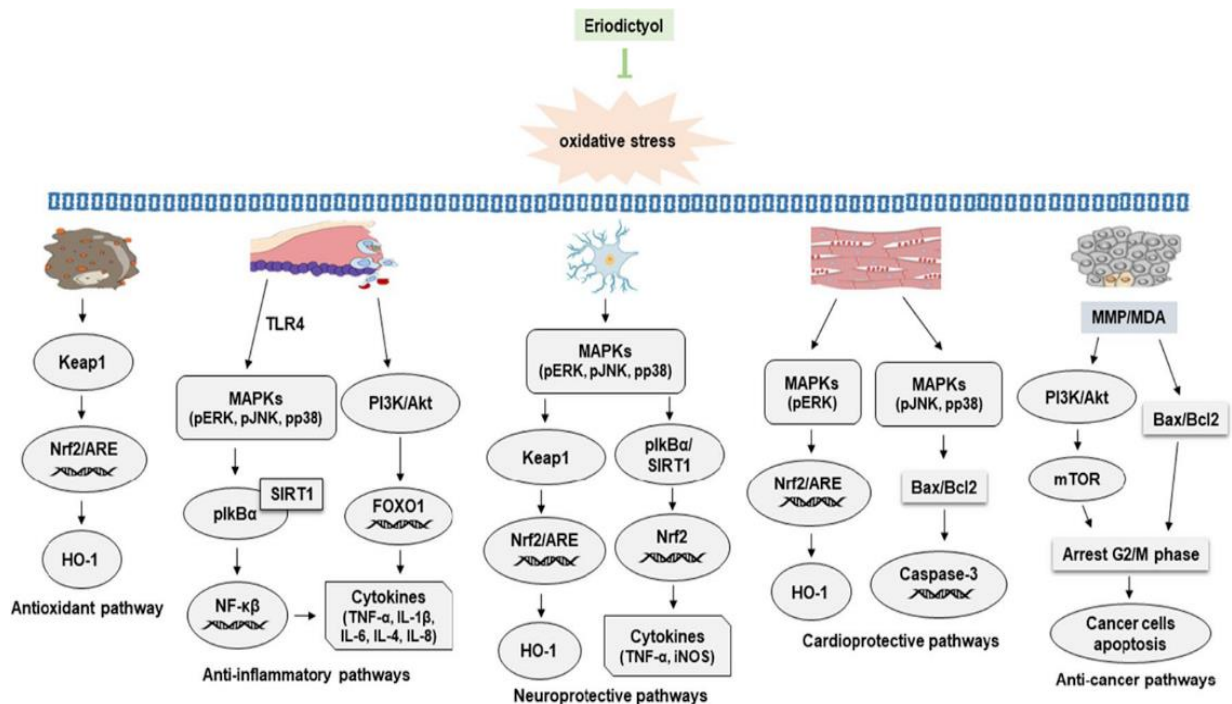
As flavanonas, também conhecidas como dihidroflavonas, são uma importante classe de flavonóides amplamente encontrada em frutas cítricas (HE *et al.*, 2019). Por exemplo, os glicosídeos de flavanona, como naringina, naringenina e naringenina 7-O-neohesperidoside, podem ser encontrados em maior concentração nas toranjas. Hesperidina, hesperetina e hesperetina 7-O-rutinoside em laranjas, tangerinas, limas e limões. Já a eriocitrina, o eriodictiol, e o eriodictiol 7-O-rutinoside estão mais presentes em limões (TERAHARA, 2015; AGRAWAL, 2011; HABTEMARIAM, 2019).

O eriodictiol é o flavonóide mais comum e mais encontrado em diversas plantas medicinais e vegetais, além das frutas cítricas. Além disso, possui propriedades medicinais consideráveis e seus estudos na literatura ajudam a esclarecer seu modo de ação em várias patologias e tipos celulares (ISLAM *et al.*, 2020).

Evidências científicas destacam seu efeito terapêutico antioxidantes (CHOBOT *et al.*, 2016; MOKDAD-BZEOUICH *et al.*, 2016), anti-inflamatórios (ZHU *et al.*, 2015), anticancerígenos (ZHANG *et al.*, 2020), neuroprotetor (WANG *et al.*, 2021; HABTEMARIAM 2019; Ferreira *et al.*, 2016), cardioprotetor (LI *et al.*, 2018), antidiabético (ZHANG *et al.*, 2012), antiobesidade (KWON; CHOI, 2019), controle da obesidade (AL-ISHAQ *et al.*, 2019), atividade insulínica (HAMEED *et al.*, 2018), hepatoprotetor (XIE *et al.*, 2017) e diversos outros (MEHMOOD; ANWAR; TABASSAM, 2021). Sendo assim, o eriodictiol pode servir como uma substância com potencial nutracêutico para melhorar a saúde dos indivíduos (Figura 10) (ISLAM *et al.*, 2020).

Em um modelo de Doença de Alzheimer, o eriodictiol preveniu os déficits cognitivos em camundongos transgênicos APP/PS1 pela inibição da ferroptosis via receptor de vitamina D mediado pela ativação da via Nrf2 (LI *et al.*, 2022). Também protegeu o comprometimento da memória de camundongos em um modelo de infusão de A β 25–35 (GUO, *et al.*, 2022). Além disso, o tratamento com eriodictiol suprimiu significativamente a peroxidação lipídica relacionada ao diabetes (GANDHI, *et al.*, 2020) e protegeu as células ganglionares da retina de animais diabéticos induzidos por estreptozotocina do estresse oxidativo, inflamação e apoptose causado por altos níveis de glicose sistêmica pela ativação da via Nrf2 (LV *et al.*, 2019).

Figura 10 - Vias de sinalização molecular do eriodictiol em várias condições de saúde relacionadas ao estresse oxidativo

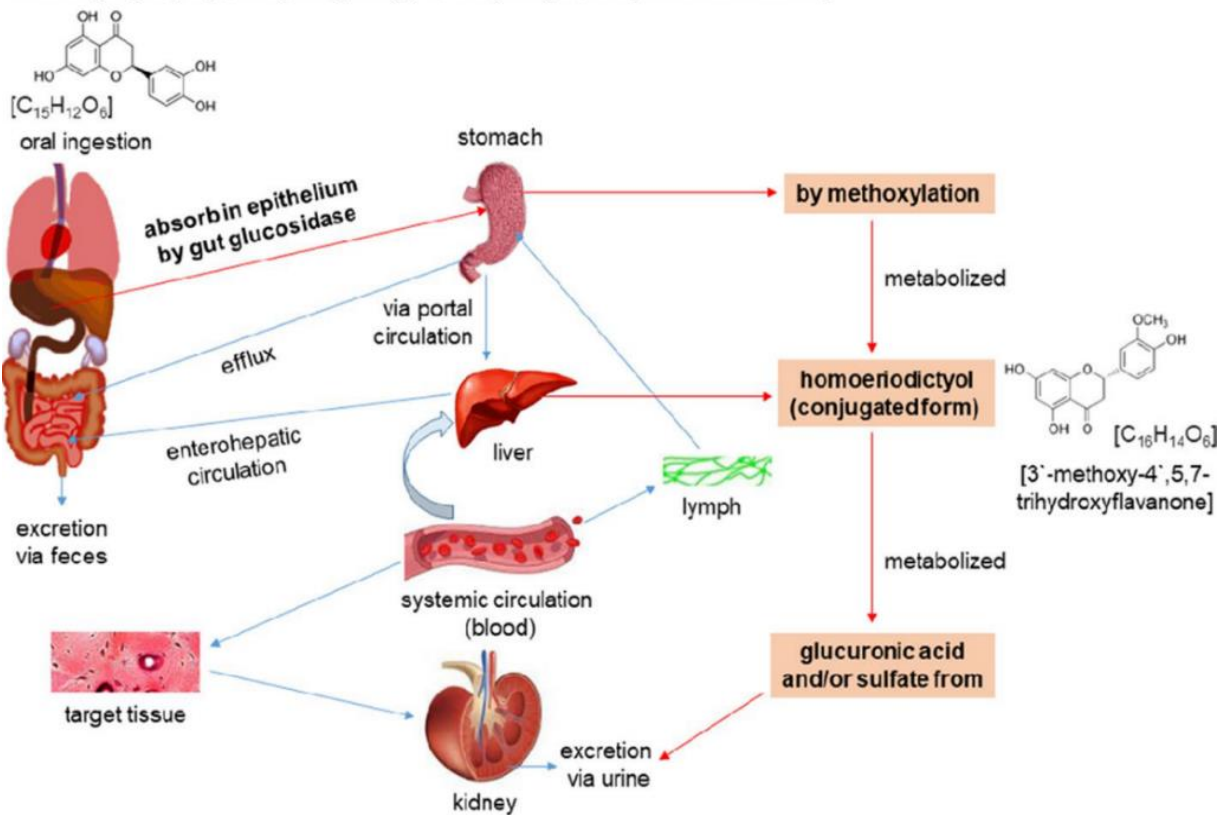


Fonte: Islam *et al.* (2020). A figura resume algumas delas, tais como, o eriodictiol aliviou o estresse oxidativo causado principalmente por ROS através das vias Keap1, Nrf2/HO-1 e ARE. A inflamação mediada pelo estresse oxidativo foi reduzida pela inibição da sinalização PI3K/Akt, FOXO1 ou ativando MAPKs, Sirt1 e, assim, bloqueando a translocação nuclear de NF- κ B. Os distúrbios neuronais mediados por ROS são auxiliados pela inibição da sinalização Keap1, Nrf2/HO-1 e ARE ou ativação de MAPKs, sinalização Sirt1 e, como resultado, bloqueio da translocação de NF- κ B. O eriodictiol também melhorou os distúrbios cardíacos mediados pelo estresse oxidativo por meio da inibição das vias de sinais MAPK/ERK, Nrf2/HO-1 e ARE ou da sinalização MAPK/JNK/p38, que mantém a relação mitocondrial Bax/Bcl-2 e, como resultado, bloqueia a translocação nuclear da caspase-3 e, conseqüentemente a apoptose. O eriodictiol também mostrou atividade anticancerígena por inibir a sinalização mTOR/PI3K/Akt e por regular a via de sinalização Bcl-2/Bax.

Estudos de farmacocinética em humanos identificaram que o eriodictiol tende a ser absorvido devagar à medida que é consumido no intestino como glucuronidação (forma extraída das plantas), após a digestão bacteriana intestinal e é metabolizado por metoxilação no fígado a homoeriodictiol em uma forma conjugada. Os metabólitos conjugados são metabolizados nos rins, liberando ácido glicurônico e/ou sulfato e promovendo a sua eliminação por via biliar e excreção urinária (ISLAM, *et al.*, 2020) (Figura 11).

Figura 11 - Farmacocinética do eriodictiol em humanos

Eriodictiol [(2S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-2,3-dihydrochromen-4-one]



Fonte: Islam *et al.* (2020).

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços nas pesquisas desenvolvidas com a DA nas últimas décadas, muitos dos mecanismos patofisiológicos que levam ao desenvolvimento da DA permanecem não esclarecidos. Sabe-se que o estresse oxidativo e a inflamação são um dos principais mecanismos que levam à morte celular na DA, mas a falta de conhecimento total da patogenia leva à dificuldade de obter tratamentos mais eficientes.

Para agravar, os custos aos sistemas de saúde de todo o mundo são altos, pois a assistência a pacientes diagnosticados com demência é de alta complexidade. Um levantamento de 2018, estimou que U\$ 1 trilhão foi destinado ao cuidado desses pacientes e que os familiares financiam os cuidados, principalmente mulheres, cuja saúde, educação e renda são colocadas em risco (PROAD, 2022).

Os flavonoides têm se mostrado candidatos potenciais à terapia coadjuvante da DA por serem capazes de atuar em diversos mecanismos patogênicos da doença como no combate ao estresse oxidativo e a neuroinflamação e que apresenta potencial terapêutico frente a outras doenças inflamatórias. Contudo, muitos estudos são necessários para determinar se os mecanismos neuroprotetores dessas substâncias são realmente eficazes na diminuição da progressão da DA e na melhora da qualidade de vida dos pacientes, o que justifica a relevância deste estudo.

Deste modo este trabalho busca investigar o flavonoide eriodictiol para avaliar o possível efeito neuroprotetor em um modelo experimental para o estudo da DA esporádica contra a toxicidade causada pela injeção de estreptozotocina (STZ) e seus possíveis mecanismos de ação utilizando o modelo *in silico*, possibilitando o desenvolvimento de terapias preventivas mais eficazes, melhorando a qualidade de vida das pessoas e impactando de forma significativa nos custos com o tratamento da DA.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Estudar os efeitos do flavonoide eriodictiol sobre a neurotoxicidade induzida por estreptozotocina (STZ) no modelo de estudo da Doença de Alzheimer Esporádica (DAE).

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o potencial neuroprotetor do eriodictiol sobre o dano neuronal induzido por STZ nos animais com DAE, analisando:

- Estudar a glicemia dos animais é alterada pela lesão cerebral causada pelo STZ;
- Estudar a atividade exploratória e memória dos camundongos;
- Estudar o estresse oxidativo (GSH, Nitrito e TBARS);
- Estudar a ativação glial astrocitária (expressão de proteína ácida fibrilar glial - GFAP) no hipocampo e no córtex pré-frontal;
- Estudar a neuroinflamação pela expressão de GFAP no hipocampo e no córtex pré-frontal por western blotting;
- Estudar a sinaptotoxicidade pela expressão de Sinaptofisina no hipocampo e córtex pré-frontal por western blotting;
- Identificar possíveis poses para integração entre o eriodictiol e as proteínas IRS1, GSK3 β e KEAP1 por docking molecular;
- Simular as conformações obtidas no docking para identificar a estabilidade e a convergência das poses de docking;
- Estudar detalhadamente por Dinâmica Molecular as interações do eriodictiol com as proteínas IRS1, GSK3 β e KEAP1 identificando o possível mecanismo de ação.

4 MATERIAIS E METODOLOGIA

4.1 Experimentos *in vivo*

4.1.1 Animais

Todos os procedimentos realizados no estudo seguiram os princípios éticos da experimentação animal, estabelecidos pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da UFC sob o número nº 4696051018.

Foram utilizados camundongos albinos adultos da estirpe Swiss, machos, com peso compreendido entre 25-35 g, provenientes do biotério central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e transferidos para o biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC.

Os animais foram mantidos sob condições de temperatura e umidade controladas, em gaiolas plásticas apropriadas, forradas com raspas de madeira à temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e com ciclo de claro/escuro de 12h/12h e com livre acesso à alimentação e à água.

4.1.2 Drogas

As seguintes substâncias foram utilizadas: Estreptozotocina (SIGMA-USA), Eriodictiol (Sigma-Aldrich, EUA), Cloridrato de xilazina 2% (Kensol® Laboratórios König S.A, Argentina); Cloridrato de ketamina 5% (Vetanarcol®, Laboratórios König S.A, Argentina). Os demais reagentes foram de grau analítico.

4.1.3 *Modelo de Doença de Alzheimer Esporádica (DAE) induzido por Estreptozotocina (STZ i.c.v)*

Os procedimentos de lesão foram realizados através da cirurgia estereotáxica. Os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg) intraperitoneal (i.p.) e cetamina (100 mg/kg i.p.) e posicionados no aparelho estereotáxico (Stoelting®). Foi realizada uma incisão sagital mediana de aproximadamente 2 cm de comprimento com um bisturi, no alto do crânio, expondo-se as suturas ósseas cranianas, com o objetivo de localizar o bregma.

Os orifícios foram perfurados no crânio em ambos os lados sobre os ventrículos laterais usando as seguintes coordenadas: 0,5 mm posterior ao bregma, 1,1 mm

lateral à sutura sagital e 2,8 mm abaixo a superfície do cérebro (PAXINOS; FRANKLIN, 2004) (Tabela 3).

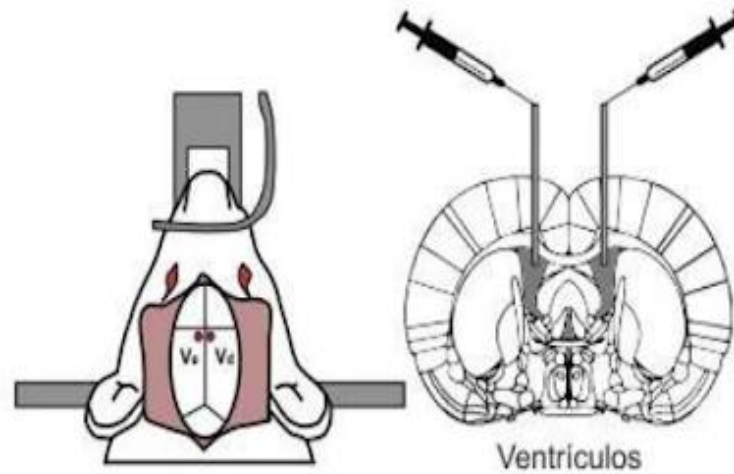
Tabela 3 - Localização das micro-injeções bilaterais de STZ nos ventrículos laterais

Coordenadas	Ponto 1 (ventriculo E)	Ponto 2 (ventriculo D)
Antero-posterior	- 0,5	- 0,5
Médio-lateral	- 1,1	+ 1,1
Ventral	+ 2,8	+ 2,8

Fonte: Adaptado de PAXINOS; FRANKLIN, 2004.

Esse modelo experimental de lesão foi proposto por Lannert e Hoyer (1998). Foram realizadas perfurações nos crânios dos animais com uma broca de baixa rotação (Dremel) em cada marcação, permitindo entrada da seringa Hamilton com o STZ (3 mg/kg) sendo injetado intracerebroventricularmente (i.c.v) de forma bi-lateral no dia 1 e 3 do experimento, em ambos ventrículos, sendo infundido 1,5 µl (45µg/1,5µl) em cada hemisfério (SHARMA; GUPTA, 2001) (Figura 12). As micro-injeções foram realizadas por administração de STZ ou solução de veículo, lentamente, ao longo de um período de 1 minuto e a agulha permaneceu na posição durante mais 5 minutos para prevenir o refluxo ao longo da seringa. Após as injeções, os cortes feitos nos animais foram suturados com fio cirúrgico de algodão (AP 0,4 15x45 cm) e desinfetados com iodo povidine. Os animais do grupo controle foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, no entanto, não receberam a neurotoxina STZ, foi introduzido somente a agulha nas mesmas coordenadas estereotáxicas, seguido de infusão de artificial Fluido Cérebro Espinal (aCSF) estéril (veículo, solução de NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, C₆H₁₂O₆).

Figura 12 - Representação da cirurgia estereotáxica



Fonte: Laboratório de Neurociência e Comportamento (LNC). À esquerda, mostrando as regiões do crânio onde foram realizados os furos para ter acesso aos ventrículos direito e esquerdo, e à direita mostrando o corte coronal da região onde foram realizadas as injeções de STZ.

4.1.4 Protocolo Experimental

O tratamento com o eriodictiol foi feito com as doses 2 ou 4 mg/kg ou veículo (Tween 3% em salina) por via oral (v.o / gavagem), uma hora após os procedimentos de indução e diariamente durante os 15 (quinze) dias que seguem após o segundo procedimento de indução, utilizando Tween 3% em salina como veículo.

As doses de 2 e 4 mg/kg foram utilizadas baseado em estudos que demonstraram que o eriodictiol apresentou efeito neuroprotetor e diminuição nos déficits cognitivos em modelo de isquemia cerebral focal permanente em camundongos (FERREIRA *et al.*, 2016).

Foram utilizados um total de 120 animais divididos em 5 grupos experimentais (n= 24 para cada grupo) de acordo com a tabela a seguir (Tabela 4).

Os animais de cada grupo foram divididos em 2 subgrupos de 12 animais. Os animais do primeiro subgrupo foram submetidos a testes para avaliar a atividade locomotora (teste do campo aberto) e avaliação de memória (teste do labirinto em Y, teste do reconhecimento de objetos e teste da esQUIVA passiva). Os animais do segundo subgrupo foram submetidos aos testes para avaliar a atividade locomotora (teste do campo aberto) e avaliação de memória espacial (teste do labirinto aquático).

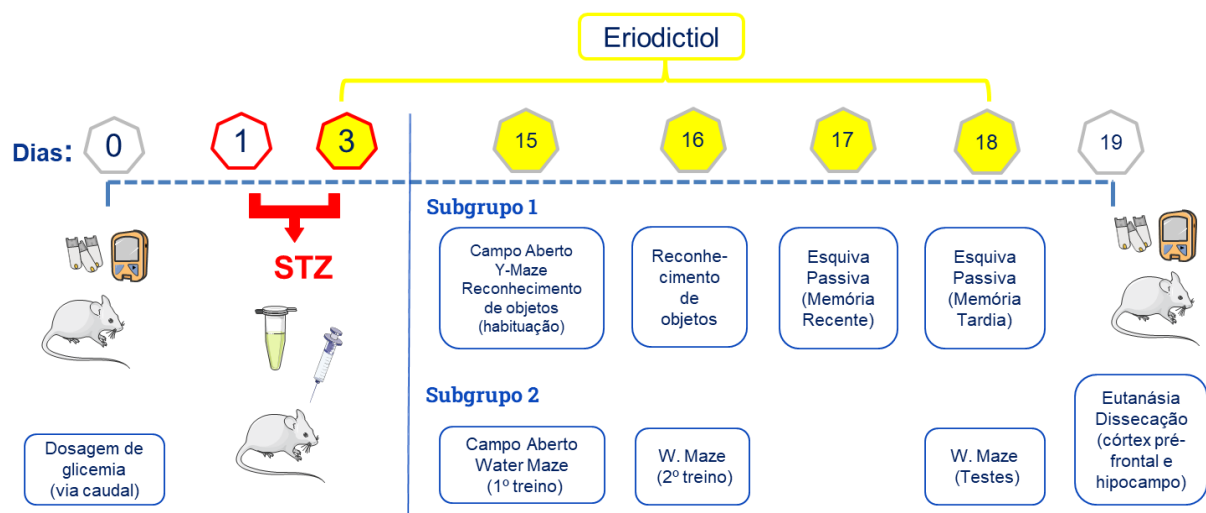
Tabela 4 - Protocolo experimental

Grupo	Tratamento	
	Intracerebroventricular (i.c.v)	Via intragástrica ou via oral (v.o)
1	Controle (aCSF)	+ Veículo (Tween 3% + salina)
2	Controle (aCSF)	+ ERI (4 mg/kg)
3	STZ (3 mg/kg)	+ Veículo (Tween 3% + salina)
4	STZ (3 mg/kg)	+ ERI (2 mg/kg)
5	STZ (3 mg/kg)	+ ERI (4 mg/kg)

Fonte: Elaborada pelo autor. **aCSF**: Fluido Cérebro Espinal artificial e **STZ**: estreptozotocina.

Os testes empregados foram realizados de acordo com o desenho experimental abaixo (Figura 13). Os testes de comportamento foram realizados 12 (doze) dias após a segunda injeção de STZ ou de aCSF. Após os testes de comportamento, os animais foram eutanasiados por decapitação e os cérebros dissecados para a retirada das áreas cerebrais (córtex pré-frontal e hipocampo), as áreas foram estocadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para avaliação bioquímica e molecular, tais como: realização das análises do estresse oxidativo (n=6) (Glutaciona Reduzida, Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e Nitrito) e a quantificação da densidade de marcadores sinápticos (sinaptofisina) e da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) por Western blotting (n=6). Os testes empregados foram realizados de acordo com o desenho experimental a seguir:

Figura 13 - Desenho experimental mostrando a seqüência dos testes realizados nos animais



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.5 Dosagem da glicemia

A dosagem da glicemia foi realizada em todos os animais, sendo feita sem restrição alimentar, para confirmar que os animais não ficaram diabéticos pela injeção i.c.v de STZ. As dosagens foram feitas imediatamente antes dos procedimentos de indução e 16 dias após as injeções de estreptozotocina. Com o auxílio de uma tesoura cirúrgica estéril, uma gota de sangue foi obtida através da perfuração da ponta da cauda dos animais. Essa amostra de sangue foi aplicada sobre uma fita teste de glicemia usada para leitura no medidor de glicose, sendo os resultados obtidos em mg/dL. Camundongos com glicemia de jejum superiores a 200 mg/dL e peso corporal acima de 55 g são classificados como diabéticos (TABAK *et al.*, 2012).

4.1.6 Testes comportamentais

4.1.6.1 Avaliação da Atividade Locomotora - Teste do Campo Aberto (Open Field)

O teste do campo aberto foi originalmente descrito por Hall (1934), para analisar o estado emocional em ratos. O teste utilizado neste trabalho foi baseado no modelo de BROADHURST (1957) com o intuito de avaliar a atividade locomotora e o comportamento exploratório do animal, pois essa atividade reflete a exploração a um contexto novo. A atividade locomotora é medida através da avaliação do montante da distância percorrida, velocidade média, número de crossings e número de rearings.

O teste foi realizado no décimo segundo dia após a última cirurgia de infusão de STZ. Utilizou-se uma arena quadrada (30 x 30 x 15 cm) de acrílico preto com o piso dividido em nove quadrados iguais (Figura 14) e durante 5 minutos foram registrados por um software, o ANY-maze (versão 4, USA), a distância percorrida, a velocidade média, o número de quadrantes atravessados pelo animal (número de cruzamentos ou crossings) e o número de vezes que o animal se levantou para explorar o ambiente mantendo-se apenas pelas patas traseiras, caracterizando o comportamento exploratório do tipo rearings. O ambiente foi iluminado apenas com luz vermelha. Após cada animal ser retirado, a arena foi limpa com álcool a 20% e secada com toalhas de papel, para evitar que o cheiro de urina e fezes interferissem no teste.

Figura 14 - Arena do teste de campo aberto dividido em quatro quadrantes iguais



Fonte: Arquivo do Laboratório de Neurociência e Comportamento (LNC).

4.1.6.2 Avaliação sobre a memória

4.1.6.2.1 Avaliação da memória de trabalho - Teste Labirinto em Y (Y-maze)

Neste teste, avalia-se a memória operacional ou de trabalho (curto-prazo) visuoespacial, que tem como principal área envolvida, o córtex pré-frontal (SARTER *et al.*, 1988). O labirinto em Y é composto por 3 braços de acrílico com 16 cm de altura, 5 cm de largura e 40 cm de comprimento (Figura 15). O animal foi colocado em um dos braços e foi feita a contagem das alternâncias espontâneas das entradas nos outros braços durante 8 minutos. Os animais controles apresentam forte tendência de alternar a entrada nos diferentes ambientes sem repetição. Todas as entradas em cada braço foram sequencialmente anotadas, havendo, assim, o registro do número total de entradas em cada braço, bem como a sequência de entradas.

Figura 15 - Fotografia do equipamento para a realização do teste de labirinto em Y



Fonte: LNC.

As informações foram analisadas para determinar o número de entradas do braço sem repetição. O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância, indicando que os animais podem lembrar em qual braço eles entraram por último (LALONDE, 2002). O resultado é expresso em porcentagem e obtido através da seguinte fórmula matemática (Figura 16):

Figura 16 - Cálculo realizado para que se tenha o resultado do teste

$$\text{Alternações espontâneas (\%)} = \frac{\text{Número de Acertos}}{\text{Número Total de entradas} - 2} \times 100$$

Fonte: LNC.

4.1.6.2.2 Avaliação da memória aversiva – Teste Esquiva passiva (Passive avoidance test)

Após 14 dias do procedimento de injeção do STZ, os animais foram habituados ao aparelho de esquiva passiva (Insight LTDA) e depois testados com o objetivo de avaliar as memórias de curta e longa duração (recente e tardia) com componente aversivo (memória de alerta, ansiedade ou aversividade) (Figura 17). Este teste foi baseado no método de De Noble e colaboradores (1986) que usa a tendência natural do animal de explorar além da plataforma e envolve o aprendizado de evitar o choque, um componente aversivo que constitui uma resposta condicionada.

O teste foi feito em uma sala isolada sob iluminação vermelha. Os animais foram habituados durante 1 minuto no aparelho de esquiva passiva, que é uma caixa de acrílico (48 x 22) com o piso eletrificado e uma plataforma não eletrificada (Figura 17). Os animais foram colocados na plataforma e deixados, um de cada vez, para ambientação no aparelho durante um 1 minuto, e depois retirados. Após 30 segundos, cada animal foi colocado novamente na plataforma. Visto que a tendência do camundongo é explorar o ambiente, ao descer da plataforma, ele recebe um choque de 0,5 mA, durante 1 segundo, com o tempo de latência para descer sendo registrado, até um máximo de 300 segundos (treino). Os animais que não desceram da plataforma levaram o mesmo choque após os 300 s de treino.

Os animais foram retirados e, após 15 minutos, colocados novamente na plataforma, sendo registrada a latência de descida (memória recente). A retenção do aprendizado foi testada após 24 horas (memória tardia), mas nessa fase, os animais não levaram choque.

Figura 17 - Aparelho esquiva passiva



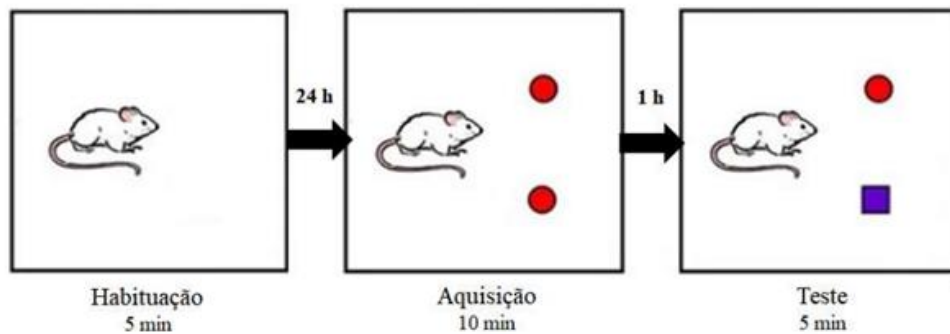
Fonte: Insight LTDA.

4.1.6.2.3 Avaliação da memória de reconhecimento – Teste do Reconhecimento de Objetos

O teste de reconhecimento de objetos é baseado na tendência natural dos animais buscarem o novo (ENNACEUR; DELACOUR, 1988) (Figura 18). Os animais foram ambientados na arena de campo aberto 24 h antes da realização do teste. O teste de reconhecimento de objetos foi realizado 13 dias após a segunda injeção STZ. O teste foi realizado na arena do campo aberto, onde dois objetos idênticos, colocados em lados opostos, foram colocados nos cantos da arena. O animal foi colocado no quadrante do meio virado para a parede, no lado oposto aos objetos.

O teste foi feito em duas sessões. Na primeira, o animal foi deixado para explorar o ambiente por 10 min. Na segunda, realizada uma hora depois, o objeto situado à direita foi substituído por um novo objeto, e foi medido o tempo de exploração em cada objeto (antigo e novo) durante 5 minutos. O índice de reconhecimento ou de discriminação foi calculado como o tempo de exploração do objeto novo menos o tempo de exploração no antigo sobre o tempo total de exploração dos dois objetos. A arena e os objetos foram limpos com álcool a 20 % entre os testes. Os seguintes comportamentos foram considerados como exploração dos objetos: farejando, lambendo ou tocando o objeto com o nariz ou com as pernas da frente ou direcionando o nariz para o objeto a uma distância ≤ 1 cm.

Figura 18 - Esquema representando a metodologia do teste de reconhecimento de objetos



Fonte: LNC.

4.1.6.2.4 Avaliação da Memória Espacial - Teste do labirinto aquático (Water Maze)

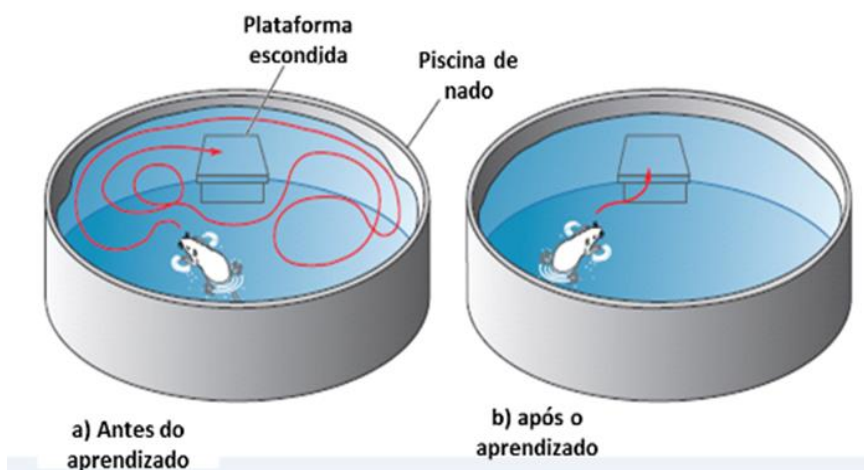
No décimo quinto dia após a primeira cirurgia, o segundo subgrupo de animais foi submetido ao labirinto aquático de Morris (1984) ou Water maze para avaliação da aprendizagem relacionada a hábitos e a memória (longo-prazo) visuoespacial.

O teste consiste em 4 treinos por dia durante 4 dias consecutivos, onde os animais são colocados em um tanque circular (180 cm de diâmetro) e paredes de 60 cm de altura, cheio até 10 cm da borda com água acrescida de tinta preta não tóxica (para deixar a água escura e destacar a cor branca do rato na câmera). O aparelho possui uma plataforma de escape de acrílico (11 x 14 cm de diâmetro) que fica submersa 2 cm abaixo da superfície da água.

A partir disso, cada rato tinha 60 segundos para achar a plataforma submersa, sendo este deixado nela durante 10 segundos e posteriormente retirado do tanque por 30 segundos, antes de iniciar o treino seguinte. Os animais que não encontram a plataforma ao final dos 60 segundos foram conduzidos gentilmente até ela.

O *software ANY-maze* (versão 4, USA) registrou o tempo de latência para o animal encontrar o local da plataforma em cada treino e número de vezes em que ele cruzou (cruzamentos) o local exato da plataforma.

Figura 19 - Representação da reação esperada do camundongo ao realizar o teste de labirinto aquático



Fonte: LNC.

4.2 Experimentos *in vitro*

4.2.1 Avaliação do Estresse Oxidativo

4.2.1.1 Determinação da peroxidação lipídica (DRAPER; HADELY, 1990)

A atividade antioxidante foi medida pela dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico através do ensaio de TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico), um indicador de peroxidação lipídica em homogenatos (DRAPER; HADELY, 1990).

No dia do ensaio, 60 μL do homogenato (10% em tampão fosfato) de córtex e hipocampo foi introduzido em tubo de eppendorf, incubado a 37°C e centrifugado a 1200 rotações por minuto (rpm) 4°C por 30 minutos. Após a centrifugação, 100 μL de ácido perclórico a 35% foi adicionado para interromper a peroxidação e, centrifugado novamente a 5000 rpm 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e a este foi adicionado 50 μL de ácido tiobarbitúrico 1,2%. Posteriormente, foi levado ao banho de água por 30 minutos a uma temperatura variável de $95-100^{\circ}\text{C}$. A solução foi retirada e colocada para esfriar a temperatura ambiente. Após esfriar, 150 μL da solução foi adicionada nos poços da placa de ELISA e foi feita a leitura da absorbância no comprimento de 535 nm. A curva padrão foi obtida mediante leitura de concentrações de malondialdeído (MDA) padrão e os resultados foram expressos em concentração (μM).

4.2.1.2 Determinação da concentração de nitrito/nitrato (GREEN *et al.*, 1982)

Nesse ensaio o reativo de Griess (N-1-naftiletilenodiamina a 0,1% em água bidestilada, sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%) revela a presença de nitrito/nitrato (NO₂/NO₃) em uma amostra (urina, plasma, homogenato tecidual) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor róseo, com um pico de absorbância em 540 nm (GREEN *et al.*, 1982).

Para realização do ensaio, os homogenatos (10% em tampão fosfato) de córtex pré-frontal e hipocampo foram centrifugados a 12000 rpm por 15 min a 4°C e 100 µL de cada sobrenadante foi adicionado a 100 µL do reagente de Griess. Para o branco, foi utilizado 100 µL do tampão fosfato e 100 µL reagente de Griess. Após 10 minutos, foi feita a leitura das absorbâncias em 540nm. A curva padrão foi obtida mediante leitura de concentrações de nitrito padrão e os resultados foram expressos em concentração (µM). As leituras da absorbância dos padrões (y) foram plotadas contra a concentração de cada padrão (x), então foi feita a determinação da equação da reta, que foi usada para a determinação da concentração de nitrito em cada amostra.

4.2.1.3 Determinação da concentração de a Glutathiona Reduzida (GSH) (SEDLAK; LINDSAY, 1968)

A Glutathiona Reduzida (GSH) é um tipo de neutralizador de baixo volume molecular, que pode remover O₂, H₂O₂ e hidroperóxidos de lipídios (LOOH). GSH é um peptídeo de molécula pequena que é composto de ácido glutâmico, glicina e cisteína, e é o principal composto tiol de não-proteína na organização.

O método utilizado baseia-se na reação do reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) - DTNB) com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico com pico de absorbância em 412 nm. A GSH pode reagir com o ácido dinitrobenzóico (DNTB) para formar um complexo amarelo que pode ser detectado por ensaio colorimétrico e calcular o conteúdo reduzido de GSH indiretamente.

O preparo das amostras foi feito da seguinte forma: 40 µL de cada amostra (homogenato do hipocampo a 10% em tampão fosfato) foi adicionada a um eppendorf seguido da adição de 50 µL de água destilada e 10 µL de TCA (ácido tricloro acético) 50%. O material foi centrifugado a 3000 rpm por 10 min e retirado 60 µL do sobrenadante que foi adicionado a

solução de DTNB em tampão Tris. A curva padrão foi obtida mediante leitura de várias concentrações de GSH padrão e os resultados foram expressos em μg .

Níveis baixos de GSH podem estar relacionados ao aumento do dano oxidativo, portanto, a quantidade de GSH é um fator vital para medir a capacidade antioxidante do organismo.

4.2.2 Avaliação da neuroinflamação e sinaptotoxicidade

4.2.2.1 Avaliação da expressão de proteínas sinaptofisina (SYN) e proteína ácida fibrilar glial (GFAP) através da técnica de Western-blot

Os animais do segundo subgrupo tiveram os cérebros dissecados, sendo o hipocampo e o córtex pré-frontal homogeneizados em tampão de lise RIPA (0,32 M sacarose, 1 mM EDTA, 10 mM Hepes, 1% BSA, pH 7,4) adicionado de inibidores de proteases (500 μL PMSF 1mM + isopropanolol, 250 μL de β -Glicerolfosfato 10mM, 257 μL de ortovanadato NaVO_3 10 mM, 25 μL coquetel de inibidores de fosfatase (Sigma) usando TissueLyser LT da QIAGEN (oscilação 50 por 1 minuto e 30 segundos). Em seguida foram centrifugados a 14.000 G por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados, a concentração de proteínas determinada pelo método de Lowry e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão. As amostras foram desnaturadas por adição de um tampão (Tris 125 mM, glicerol 20%, DTT 100 mM, SDS 4%, e de Azul de Bromofenol 0,02%) e seguida de aquecimento a 95°C durante 5 min.

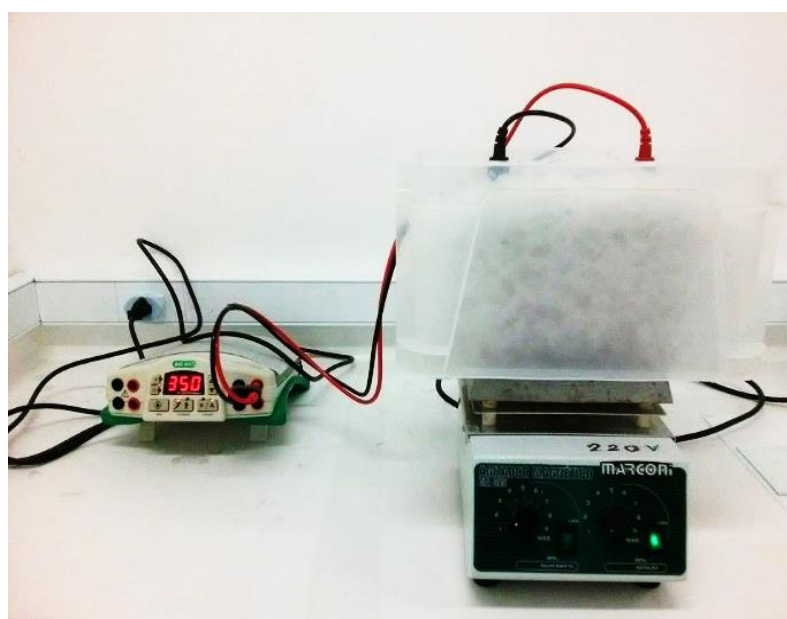
Quantidades iguais de proteínas totais (25 μg) foram aplicadas em cada poço de gel de poliacrilamida-SDS 12,5 %, utilizando-se o sistema Mini Protean®3Cell (Bio-Rad, EUA). Adicionou-se tampão de corrida (Tris 25 mM; Glicina 192 mM e SDS 0,1%) e em seguida iniciou-se a corrida em condições constantes de voltagem (120 V) e variável de miliamperagem (80 mA). Após a separação proteica, deu-se início a transferência (por 1h30, 110 V, 400 mA) na membrana de difluoreto de polivinildieno (PVDF) (Bio-Rad) previamente ativada por imersão em metanol durante 5 segundos, seguida de uma imersão em tampão de eletrotransferência (Tris 25mM; Glicina 192mM e Metanol 20%).

Logo em seguida, as membranas foram lavadas com tampão de lavagem (8g NaCl, 2,42g Tris Base em água MilliQ, pH 7,6 - TBS-T) e bloqueadas com leite desnatado a 5% em TBS-T por uma hora sob agitação à temperatura ambiente. Em seguida as membranas foram incubadas por 24h em TBS-T contendo os anticorpos: anti- α tubulina produzida em coelho

(1:2000; Sigma), anti-sinaptofisina produzida em camundongo (1:1000; Santa Cruz Biotechnology) e anti-GFAP produzida em camundongo (1:2000; Sigma). No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com os anticorpos secundários marcados com peroxidase: anti-IgG de camundongo e coelho (1:2000; Millipore) por 1 hora.

Após a incubação, a membrana foi novamente lavada com TBS-T e as bandas imunorreativas foram reveladas com luminol (Bio Rad). Para a análise densitométrica, as bandas foram quantificadas por análise computadorizada de imagem (com auxílio do software Image Lab versão 6.1 Bio Rad) onde a densidade óptica de cada banda foi detectada. Foi feita a relação sinaptofisina/tubulina e GFAP/tubulina e o valor final de intensidade relativa foi expresso em porcentagem em relação ao grupo controle (aCSF + veículo) de todos os experimentos realizados.

Figura 20 - Sistema de western blotting montado



Fonte: LNC

4.3 Experimentos *in silico*

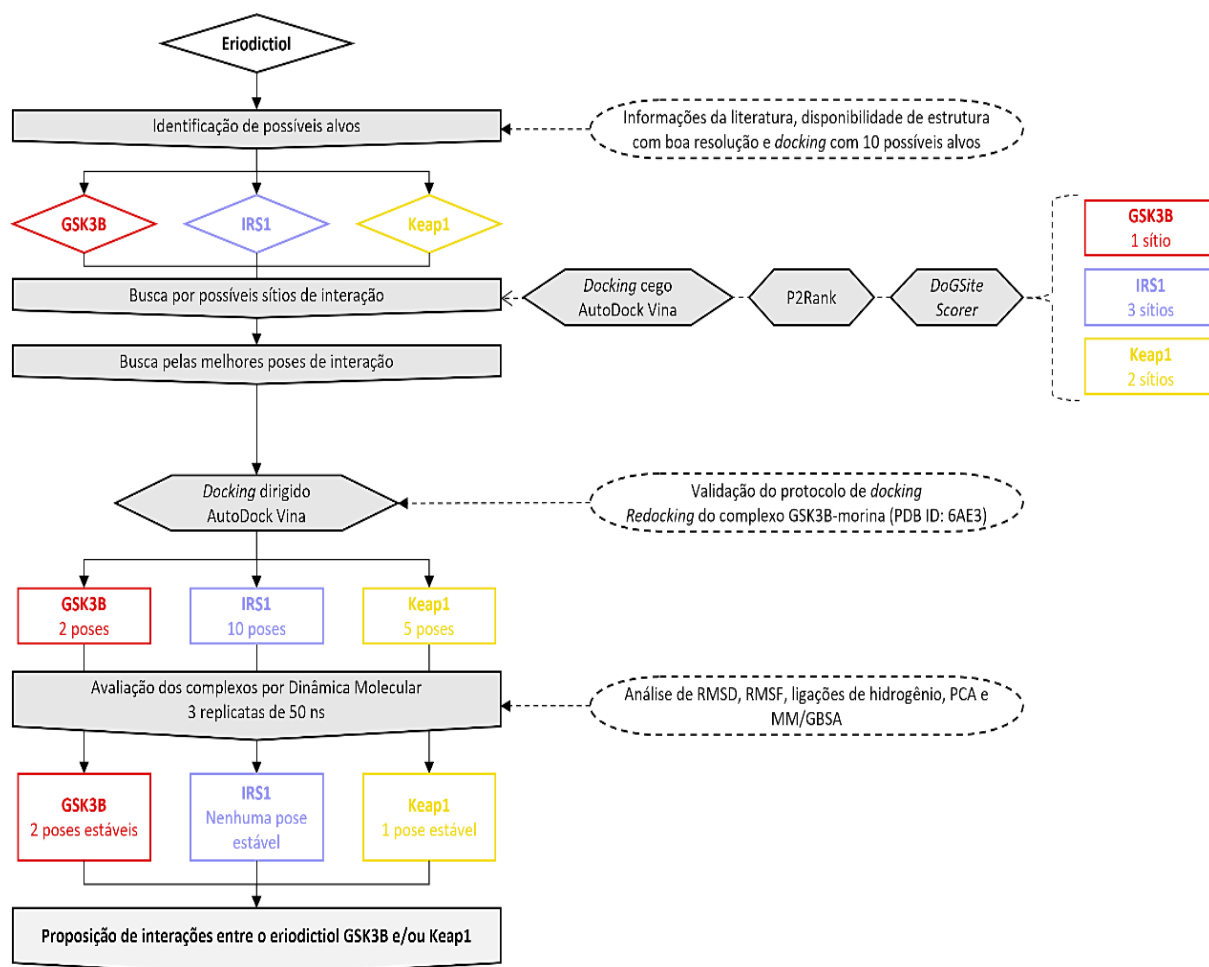
Os experimentos computacionais foram realizados com o objetivo de compreender e inferir a nível molecular os possíveis mecanismos de ação neuroprotetores do eriodictiol. O resumo das metodologias utilizadas está sintetizado na Figura 21.

A metodologia *in silico* empregada partiu da pesquisa de alvos proteicos já identificados em estudos anteriores relacionados aos efeitos neuroprotetores do eriodictiol

correlacionados à fisiopatologia da Doença de Alzheimer. Foi adotado como critério de seleção a disponibilidade de estruturas cristalográficas, com boa resolução, das proteínas nos bancos de dados no RCSB *Protein Data Bank* (RCSB PDB) ou no AlphaFold e os valores de afinidade preditos em um experimento preliminar de *docking* cego (blind docking) com dez proteínas-alvo: receptor de insulina substrato 1 (IRS1), enzima glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β), Kelch-like ECH associated protein 1 (Keap1), Apolipoprotein E3 (apoE3), mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), peroxisome proliferators-activated receptors gamma (PPARgamma), Insulin-Like Growth Factor 1 (IGFR1), Synaptophysin (SYN), Toll Like Receptor 4 (TLR4) e phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K), usando o AutoDock Vina.

Posteriormente, foi realizada a busca por possíveis sítios de interação nas proteínas GSK3 β , IRS1 e Keap1 utilizando, além do *docking* cego, os softwares preditores de cavidade P2Rank e DoGSiteScorer. O procedimento de *docking* usando o AutoDock Vina foi validado através do *redocking* do flavonóide morina que foi co-cristalizado à proteína GSK3 β (PDB ID 6AE) e utilizado para novos ensaios de *docking* dirigido tendo como alvo os sítios previamente identificados. Os complexos resultantes foram submetidos a simulações de dinâmica molecular e avaliados quanto a sua estabilidade e interações, sendo possível, ao final, propor um possível mecanismo de ação do eriodictiol mediado por interações com GSK3 β , Keap1 e/ou IRS1.

Figura 21 - Metodologia computacional



Fonte: Fiocruz – CE.

4.3.1 Avaliação por docking molecular

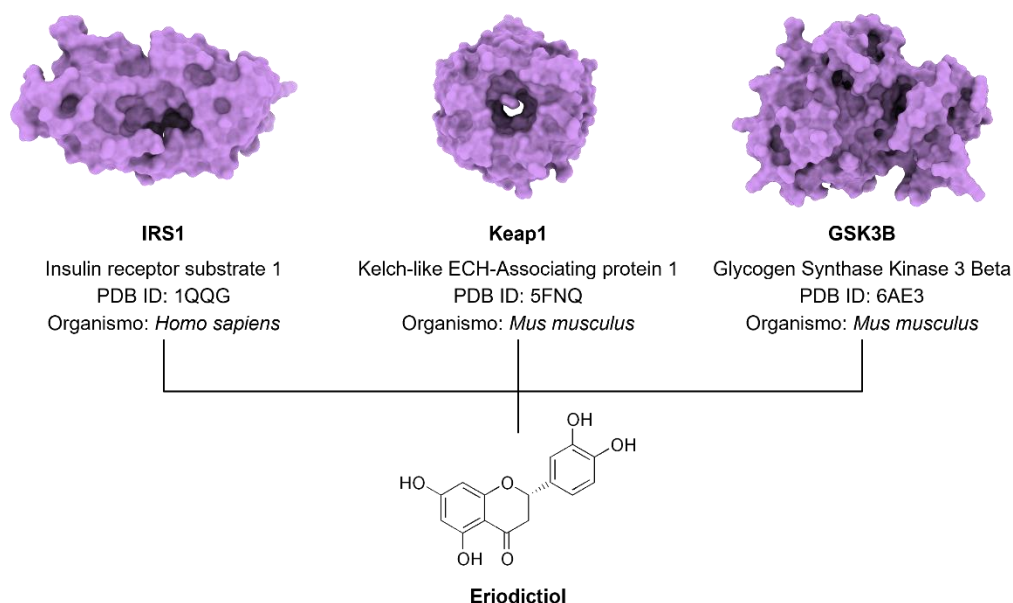
O *docking* (atracamento) molecular fornece as informações necessárias para compreender o modo interações entre as moléculas, elucidando diversos processos bioquímicos importantes (LENGAUER; RAREY, 1996; SHAN *et al.*, 2011). O cálculo envolve a investigação da conformação dos complexos proteína-ligante e orientação do ligante no sítio (*pose*), levando em consideração as interações eletrostáticas, de van der Waals, a complementaridade de superfícies e a predição de pontuação de ligação. A pontuação ou *scoring* informa um valor predito equivalente a uma afinidade de ligação ou se a posição relativa do complexo proteína-ligante é viável, podendo representar determinado modelo visualizado experimentalmente.

Também está bem estabelecido na literatura a importância da execução de simulações de dinâmica molecular subsequentes ao *docking* para avaliar os resultados, tendo como parâmetro principal a estabilidade e o comportamento dos ligantes no sítio de interação estudado (FISCHER *et al.*, 2021).

4.3.1.1 Identificação de possíveis alvos de interação com eriodictiol

Inicialmente, foram feitas revisões bibliográficas sobre os alvos moleculares afetados pelo eriodictiol e buscas em bancos de dados abertos por estruturas cristalográficas murinas, preferencialmente, ou humanas das proteínas-alvo prioritárias: receptor de insulina substrato 1 (IRS1), enzima glicogênio sintase quinase 3β (GSK3 β) e Kelch-like ECH associated protein 1 (Keap1) (Figura 22). As estruturas de tais proteínas foram obtidas a partir do banco de dados do *Protein Data Bank* sob PDB ID 1QQG (DHE-PAGANON, *et al.*, 1999), 6AE3 (KIM *et al.*, 2018) e 5FNQ (THOMAS *et al.*, 2016), respectivamente. Adicionalmente, outros sete alvos proteicos correlacionados à Doença de Alzheimer foram testados quanto a interação com o eriodictiol: apoE3 (PDB ID: 2L7B; CHEN; WANG, 2011), MAPK1 (AlphaFold Protein Structure Database), PPARgamma (PDB ID: 2ZVT; WAKU, 2009), IGFR1 (PDB ID: 5U8R; LAWRENCE, 2018), SYN (AlphaFold Protein Structure Database, Q62277), TLR4 (PDB ID: 3VQ2a; OHTO & SHIMIZU, 2012) e PI3K (PDB ID: 6TNS; CONVERY *et al.*, 2020).

Figura 22 - Proteínas-alvo do estudo de interação do ligante eriodictiol por docking molecular



Fonte: Fiocruz – CE. As estruturas das proteínas IRS1, Keap1 e GSK3 β foram obtidas através dos seus códigos PDB ID na base do Protein Data Bank e a representação de superfície das estruturas foi gerada usando o programa ChimeraX v. 1.2.

O *docking* cego foi utilizado como ferramenta para ranquear, qualitativamente, os alvos proteicos listados.

A preparação das estruturas das proteínas para o *docking* foi iniciada no PyMOL, pertencente a Schrodinger, realizando a remoção de moléculas de água e ligantes, quando presentes. Todas as proteínas foram tratadas com a ferramenta de modelagem de loops Chimera (*Modeller*) para completar os resíduos e átomos que estivessem faltando a partir da estrutura cristalográfica.

Em seguida, o programa PROPKA, incorporado no servidor web PDB2PQR (DOLINSKY *et al.*, 2004; OLSSON *et al.*, 2011), foi utilizado para determinar o estado de protonação dos resíduos da proteína em pH fisiológico (7,4). (ROSTKOWSKI *et al.*, 2011). Paralelamente, para preparar a molécula de eriodictiol para o *docking*, sua estrutura 3D foi obtida através do PubChem (CID: 440735) e seu estado de protonação para o mesmo pH foi determinado usando o programa Marvin Sketch que, segundo a predição, aponta que o eriodictiol é prevalentemente neutro em pH 7.4.

Tanto os arquivos das proteínas e do ligante foram utilizados pelo AutoDock Vina no formato pdbqt, levando em conta a presença apenas de hidrogênios polares na estrutura e da adição de cargas parciais (Gasteiger charges). As coordenadas e o tamanho das caixas para o cálculo de *docking* cego englobaram toda a superfície das proteínas, foram obtidos com o

programa AutoDock Tools (MORRIS *et al.*, 2009). O docking foi realizado utilizando o AutoDock Vina e os valores de afinidade predita (kcal/mol) recuperados dos arquivos de resultado.

4.3.1.2 Busca por possíveis sítios de interação

Para conhecimento do sítio mais provável de interação das proteínas prioritárias IRS1, GSK3B e Keap1 com o eriodictiol como ligante, também foi realizada a predição de cavidades com dois diferentes servidores/*softwares* (DoGSiteScorer e P2Rank) para mensurar a propensão do ligante ocupar os sítios na superfície das proteínas.

O DoGSiteScorer (VOLKAMER *et al.*, 2012), incorporado no servidor ProteinPlus, é uma ferramenta automática de predição e caracterização de cavidades que detecta potenciais cavidades para ligação de uma molécula em uma proteína a partir da mensuração de propriedades globais, como volume, área, profundidade, abertura e composição química dos aminoácidos. A partir da análise das informações geométricas e físico-químicas, o programa estima a pontuação e drogabilidade, que quantifica a capacidade da cavidade de ser modulada por pequenas moléculas, tendo valores variando entre zero e um. Quanto maior a pontuação, mais drogável a cavidade é estimada ser (VOLKAMER *et al.*, 2012).

O segundo preditor utilizado (P2Rank) é uma ferramenta de predição de cavidades de interação para ligantes baseada em aprendizado de máquina que passa a representar a superfície acessível ao solvente da proteína por pontos que retratam a vizinhança química local, tendo como base as características físico-química dos aminoácidos presentes em cada região. Os pontos são avaliados quanto ao seu valor de “ligabilidade”, e pontos com uma pontuação elevada são, então, agrupados para formar os possíveis sítios de interação ao ligante (KRIVÁK; HOKSZA, 2018).

4.3.1.3 Busca pelas melhores poses de interação em cada sítio predito

Com base nas informações dos sítios caracterizados para as proteínas IRS1, GSK3B e Keap1, foram realizados novos cálculos de *docking*, direcionando as caixas de cálculo para tais regiões. As coordenadas e tamanho das caixas para o *docking* dirigido foram obtidas usando o software AutoDock Tools (Tabela 5) e os cálculos utilizaram o AutoDock Vina e os arquivos pdbqt das proteínas e do ligantes obtidos previamente. O *docking* gerou dez poses para cada sítio das três proteínas, que foram analisados visualmente utilizando o programa PyMOL. A

inspeção visual teve como objetivo garantir que as *poses* varressem diferentes conformações da molécula em cada sítio, levando a seleção de uma a quatro *poses* do eriodictiol em cada cavidade para avaliação por dinâmica molecular. O diagrama 2D de interações do eriodictiol nos modos de ligação preditos foram gerados usando o Discovery Studio 2021.

Tabela 5 - Configurações de caixa para os cálculos de docking dirigido

Proteína	PDB	Sítio	Configurações da caixa de <i>docking</i>					
			Eixo X		Eixo Y		Eixo Z	
			Tamanho	Centro	Tamanho	Centro	Tamanho	Centro
IRS1	1QQG	1	20	15.732	24	54.836	22	41.461
		2	20	2.369	24	35.508	22	31.546
		3	20	7.546	24	33.392	22	40.318
Keap1	6AE3	1	20	19.202	24	66.366	22	24.661
		2	20	19.202	24	63.451	22	45.337
GSK3B	5FNQ	1	20	23.709	24	12.478	22	-12.735

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.2 Simulações de Dinâmica Molecular

A Simulação de dinâmica molecular (DM) consiste no cálculo dos movimentos de átomos individuais ou de moléculas ao longo do tempo, de acordo com a segunda lei de Newton. Neste processo foi aplicado um campo de força para calcular alguns fatores físicos, como velocidade, aceleração e posição do átomo (VERLI, 2014). Esta simulação pode não apenas mostrar a variação estrutural sob mudanças ambientais, como pH, temperatura e mutações de resíduos, mas também pode exibir tanto o processo dinâmico de reconhecimento e interação de uma pequena molécula com um receptor, como também o dobramento e agregação de proteínas e peptídeos (HASSAN *et al.*, 2018).

Simulações de dinâmica molecular dos complexos eriodictiol e IRS1/GSK3 β /Keap1 foram executadas por meio do pacote de programas Amber19 (CASE *et al.*, 2018) aplicando o campo de força ff14SB (MAIER *et al.*, 2015) para as proteínas e gaff2 (WANG *et al.*, 2004) para a pequena molécula do eriodictiol. Para estas simulações, foram utilizados o barostato Monte Carlo e o termostato de Langevin. As simulações foram realizadas utilizando o método Particle Mesh Ewald (PME) (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993) para tratar as interações eletrostáticas e foi levado em consideração um cutoff de 10,0 Å para interações de longas distâncias.

A inclusão de restrição de ligações sob os átomos de hidrogênio por meio do algoritmo SHAKE (RYCKAERT; CICCOTTI; BERENDSEN, 1977) e o uso do Particionamento de Massa de Hidrogênio (HMR, do inglês “Hydrogen Mass Repartitioning”) permitiu o uso de um tamanho de passo (“time step”) de 4 fs para as simulações (HOPKINS *et al.*, 2015).

As simulações de DM envolveram etapas de tratamento e preparação dos sistemas (minimização energética, aquecimento do sistema, ajuste de densidade e equilibração), seguida da dinâmica de produção propriamente dita. Na etapa de tratamento, os complexos proteína/ligante foram inseridos em uma caixa de simulação octaédrica de 15 Å usando o módulo LEaP pertencente ao AmberTools19.

Os sistemas foram solvatados com água TIP3P (JORGENSEN *et al.*, 1983), e neutralizados com a concentração dos íons Na⁺ e Cl⁻ ajustada para 0.15 M, assemelhando-se a concentração salina fisiológica. Já na etapa de preparação, a minimização de energia dos sistemas foi realizada em três etapas e contou com restrição no movimento dos átomos, de forma a acomodar melhor o sistema. Na primeira (por 2 mil ciclos), tanto a proteína como o eriodictiol foram mantidos restringidos. Na segunda (novamente por 2 mil ciclos), apenas a proteína foi submetida a restrições. Na terceira (por 5 mil ciclos), todos os componentes do sistema foram deixados livres para interagirem. As restrições aplicadas utilizaram uma força de 500 kcal/mol/Å².

Os complexos foram aquecidos gradualmente para 310 K (equivalente a aproximadamente 37 °C) a volume constante (NVT) durante 50 ps com a proteína sob força de restrição de 10 kcal/mol/Å². O ajuste de densidade foi realizado durante 300 ps sob pressão constante de 1 atm, e contou com a aplicação de uma força de restrição da mesma intensidade da etapa anterior. Uma última etapa de equilibração ocorreu ao longo de 5 ns sem restrições aplicadas. A dinâmica de produção foi realizada por 50 ns, sob condições NVT e foram realizadas três replicatas para cada complexo.

4.3.2.1 Análise das trajetórias

O módulo cpptraj, presente no AmberTools19, foi utilizado no processamento e na análise dos arquivos de coordenadas e trajetórias oriundos das simulações de dinâmica molecular. A análise de RMSD (do inglês: *root mean square deviation* ou desvio quadrático médio) e RMSF (do inglês: *root mean square fluctuation* ou flutuação quadrática média) permitiram mensurar a flexibilidade da estrutura das proteínas IRS1, GSK3β ou Keap1 a nível

molecular ou de resíduos entre as estruturas oriundas das simulações e aquelas obtidas pelo *docking*. O RMSD também foi calculado para o eriodictiol em relação à pose de *docking* e à pose final da DM, buscando por possíveis indicativos de convergência. O RMSF mede a amplitude dos movimentos dos átomos durante a simulação e foi utilizado para aferir a variação da flexibilidade das diferentes regiões da proteína. Adicionalmente, foi computada a formação de ligações de hidrogênio entre o ligante e as proteínas. A análise de Componente Principal (PCA, do inglês Principal Component Analysis das trajetórias utilizou o programa pyPcazip (SHKURTI *et al.*, 2016) é uma técnica de redução de dimensionalidade que pode ser usada para comprimir os dados de simulações computacionais sem perda significativa de informação (SHKURTI *et al.*, 2016). Esta análise possibilitou verificar a direção e a amplitude dos movimentos da cadeia principal das proteínas, traduzindo-os por meio de componentes principais e demonstrando o impacto da interação com o ligante sobre as conformações amostradas pelas proteínas.

A construção do perfil de interações entre as proteínas e o ligante foi complementada com a técnica de MM/GBSA, utilizada para mensurar a energia de ligação entre as proteínas IRS1, GSK3B ou Keap1 e o ligante eriodictiol. O script MMPBSA.py (MILLER *et al.*, 2012) embutido no pacote AmberTools19 foi utilizado para esta finalidade. Neste sentido, foi salvo 1 frame a cada 400 ps (tempo), totalizando 125 quadros por análise das simulações de dinâmica molecular fornecidos ao programa. O número de quadros analisados seguiu protocolos existentes na literatura que apontam o uso e a confiabilidade estatística de valores maiores que 100 quadros (PAISSONI *et al.*, 2014; TAVASSOLI; TAGHDIR; RANJBAR, 2018). Decomposições de energia por resíduos do sítio de interação também foram realizadas para todos os quadros analisados, permitindo avaliar a contribuição individual destes resíduos ao longo da trajetória.

A visualização tridimensional dos complexos proteína/eriodictiol foi realizada por meio do programa PyMOL e o ChimeraX (GODDARD *et al.*, 2018).

4.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelos *Softwares* R e GraphPad Prism 8.01 (GraphPad Software, Inc.) e todos os dados expressos como média \pm EPM (erro padrão médio). Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk para verificar se os dados apresentavam distribuição normal, sendo determinado o uso de testes paramétricos ou de testes não-paramétricos para a avaliação estatística dos resultados.

Nos resultados que apresentaram uma distribuição normal, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey para comparações dentro dos grupos. Já nos resultados que não apresentaram uma distribuição normal foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguida pelo teste de Dunn's como teste post-hoc. Em todos os testes o critério de significância utilizado foi $p < 0,05$, ou seja, se descartou a hipótese nula dos testes estatísticos. Se $p \geq 0,05$ admitimos que a hipótese nula é verdadeira.

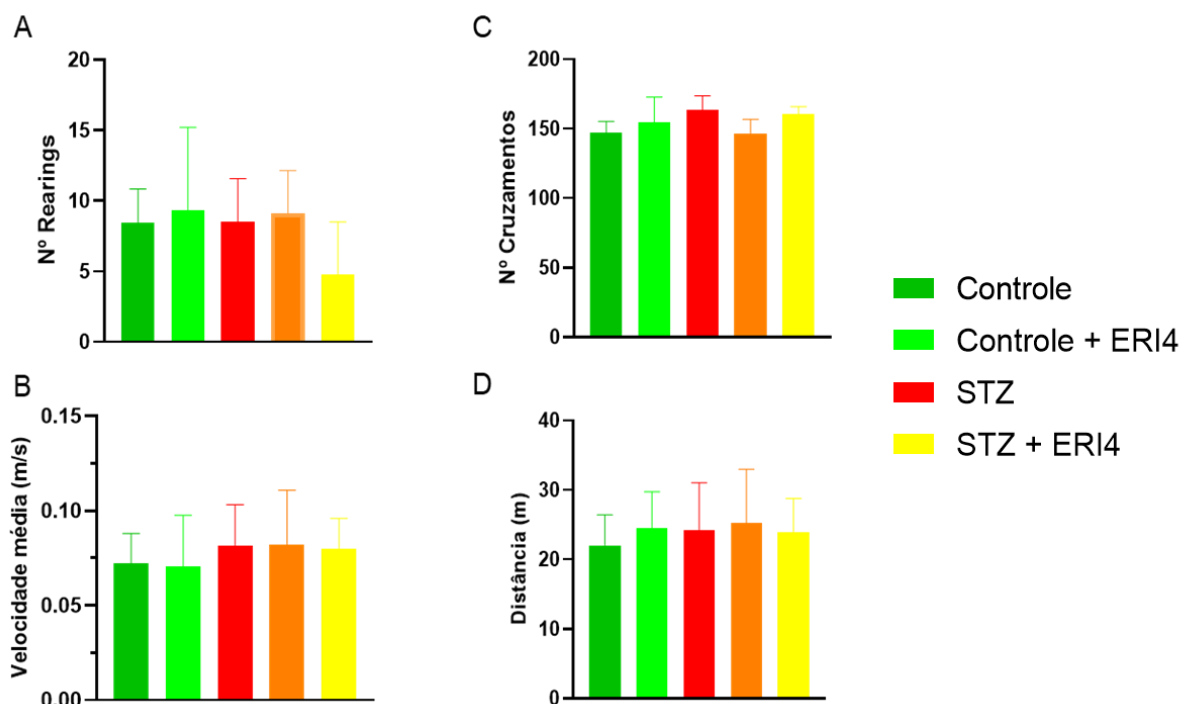
5 RESULTADOS

5.1 Experimentos *in vivo*

5.1.1 Efeitos do eriodictiol sobre a atividade locomotora (Teste do Campo aberto) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção i.c.v de STZ

Os resultados obtidos no teste de campo aberto demonstraram que nenhuma alteração significativa foi verificada na atividade exploratória do animal com i.c.v STZ em relação ao: número de *rearings* (Controle: $8,44 \pm 2,4$; STZ: $8,5 \pm 3,07$, $p = 0,0924$), número de *crossings* (Controle: 147 ± 30 ; STZ: $163,2 \pm 33,01$, $p = 0,67$), velocidade média (Controle: $0,072 \pm 0,016$; STZ: $0,081 \pm 0,022$, $p = 0,719$) e na distância percorrida (Controle: $22,04 \pm 4,38$; STZ: $24,15 \pm 6,91$, $p = 0,825$) (Figura 23). Os valores estão representados como média \pm EPM e critério de significância de $p < 0,05$, não apresentando diferenças estatísticas entre os grupos do estudo nos parâmetros avaliados. Demonstrando, que não houve nenhuma alteração no comportamento exploratório e atividade locomotora com a infusão do STZ e com o tratamento com o eriodictiol nas duas doses testadas.

Figura 23 - O efeito do tratamento com o eriodictiol (2 e 4 mg/kg, v.o) no número de rearings (A), na velocidade média (B), no tempo de imobilidade (C) e na distância percorrida (D) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por STZ no teste do campo aberto (n =8-10)

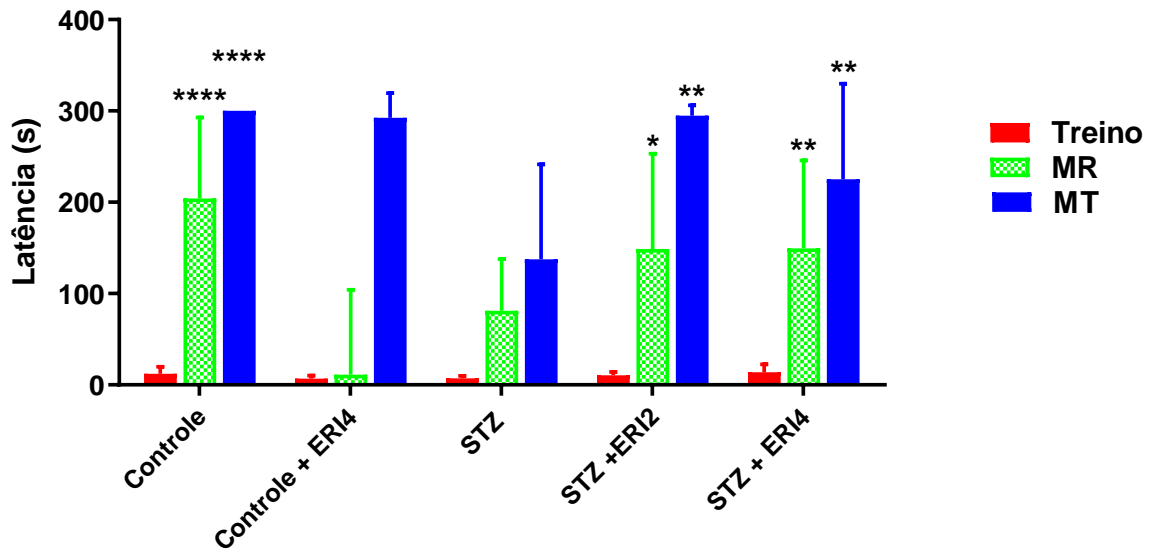


Fonte: Elaborada pelo autor. Os animais (n = 8 - 10 animais/grupo) foram tratados com eriodictiol (2 e 4 mg/kg v.o.) durante 16 dias, sendo os parâmetros avaliados pelo software ANYmaze (Stoelting Co., USA) por 5 minutos, 12 dias após a injeção de STZ. Foram avaliados o número de rearings (A), a distância percorrida (B), o número de crossings (C) e a velocidade média (D). Os valores estão representados como média \pm EPM. ANOVA de uma via e todos os parâmetros apresentaram $p > 0,05$, não apresentando diferenças estatísticas entre os grupos do estudo nos parâmetros avaliados.

5.1.2 Efeitos do eriodictiol sobre a memória aversiva (Teste da Esquiva Passiva) de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ

Através do teste da esquiva passiva, os animais i.c.v STZ apresentaram déficits na latência da memória recente (MR) (Controle: $204,32 \pm 88,46$; STZ: $81,23 \pm 56,61$, $p < 0,001$), e na memória tardia (MT) (Controle: 300 ± 0 ; STZ: $137,66 \pm 103,88$, $p < 0,0001$) quando comparados aos animais do grupo controle. O tratamento com eriodictiol (2 e 4 mg/kg) protegeu significativamente de déficits na memória recente MR: (STZ + ERI2: $148,96 \pm 104,25$, $p < 0,05$), (STZ + ERI4: $149,42 \pm 96,3$, $p < 0,001$) e tendência a proteção não significativa na memória tardia MT: (STZ + ERI2: $294,96 \pm 11,27$, $p < 0,01$), (STZ + ERI4: $225,18 \pm 104,57$, $p < 0,01$) (Controle: 300 ± 0 ; STZ + ERI4: $225,18 \pm 104,57$, $p < 0,05$).

Figura 24 - O eriodictiol (2 e 4 mg/kg, v.o) previne o déficit na memória aversiva em camundongos submetidos ao modelo de DAE por STZ



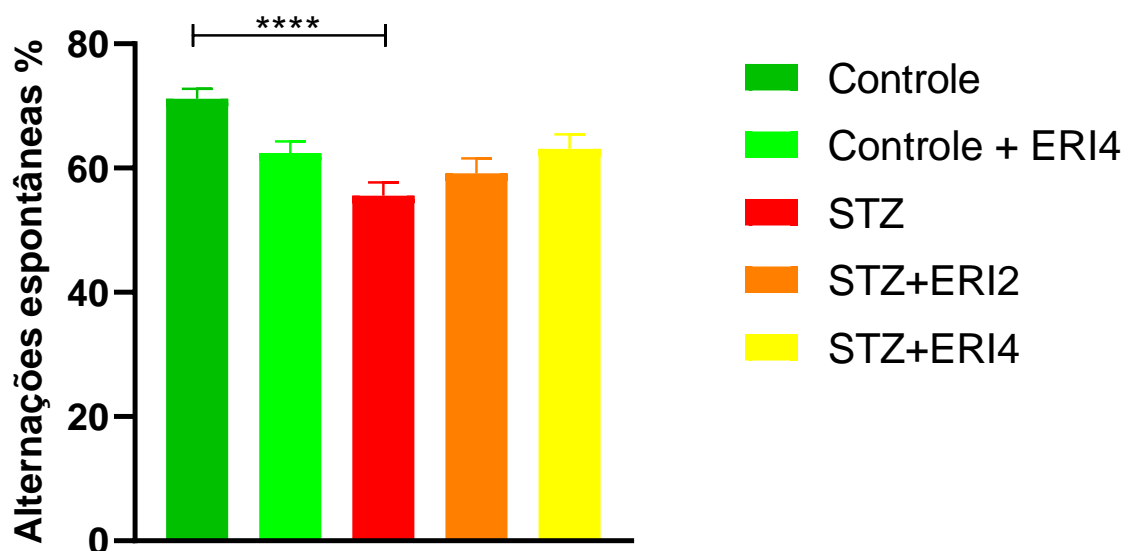
Fonte: Elaborada pelo autor. Os valores da latência da Esquiva Passiva estão em média \pm EPM. Significância representada por Kruskal-Wallis e Teste de Dunn's ($n = 8 - 10$). ns: $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ quando comparado ao grupo STZ. MR (Memoria Recente); MT (Memoria Tardia); STZ (Streptozotocina); ERI2 (Eriodictiol 2 mg/kg) e ERI4 (Eriodictiol 4 mg/kg).

5.1.3 Efeitos do eriodictiol sobre o déficit na memória de trabalho (Teste do Labirinto em Y) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ

Na avaliação da memória de trabalho através do teste do labirinto em Y, os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram déficits significativos na porcentagem de alternâncias espontâneas (Controle: $71,18 \pm 6,16$; STZ: $55,53 \pm 10,38$, $p < 0,05$) quando comparados aos animais do grupo controle. (Figura 25). Os valores estão representados como média \pm EPM. ANOVA de uma via, seguido do Teste pos hoc de Tukey ($p < 0,05$).

Nenhuma dose de tratamento com eriodictiol protegeu os animais contra os déficits de memória de trabalho (STZ + ERI2: $59,14 \pm 5,36$) (STZ + ERI4: $63,11 \pm 7,45$). Os valores estão representados como média \pm EPM. ANOVA de uma via, seguido do Teste pos hoc de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 25 - Efeito do eriodictiol (2 e 4 mg/kg) sobre a memória de trabalho em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ



Fonte: Elaborada pelo autor. Os valores das alterações espontâneas do teste do Labirinto em Y (Y-Maze) estão em média \pm EPM. Significância representada por ANOVA de uma via, seguido do Teste pos hoc de Tukey (n = 8 - 10). ns: $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ quando comparado ao grupo STZ. STZ (Streptozotocina); ERI2 (Eriodictiol 2 mg/kg) e ERI4 (Eriodictiol 4 mg/kg).

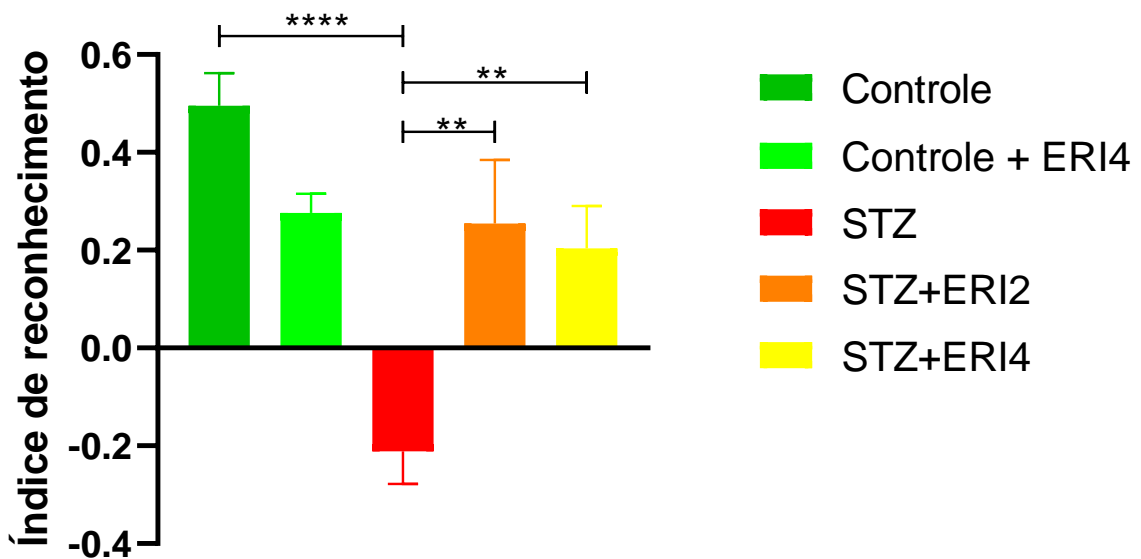
5.1.4 Efeitos do eriodictiol sobre o déficit na memória de reconhecimento (Teste de Reconhecimento de Objetos) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ

Na avaliação do índice de reconhecimento através do teste reconhecimento de objetos, os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram déficits na memória recente em relação à habilidade de reconhecer um novo objeto (Controle: $0,4956 \pm 0,2584$; STZ: $-0,2117 \pm 0,31141$, $p < 0,0001$) e na memória tardia (Controle: $0,2193 \pm 0,2194$; STZ: $-0,2913 \pm 0,1722$, $p < 0,0001$) quando comparados aos animais do grupo controle, apresentando menor índice de reconhecimento. Os valores estão representados como média \pm EPM. Os dados apresentaram normalidade (SHAPIRO- WILK, $p > 0,05$) e por isso foram analisados por ANOVA ONE WAY, seguido do Teste pos hoc de Tukey.

O tratamento com o eriodictiol protegeu significativamente na memória recente (STZ + ERI2: $0,2547 \pm 0,2905$, $p < 0,01$), (STZ + ERI4: $0,2037 \pm 0,2594$, $p < 0,01$) (Figura 26) e tardia (STZ + ERI4: $0,0752 \pm 0,2099$, $p < 0,001$) (Figura 27) no índice de reconhecimento do objeto. Os animais foram tratados com eriodictiol (2 e 4 mg/kg, v.o.) durante 16 dias, sendo o

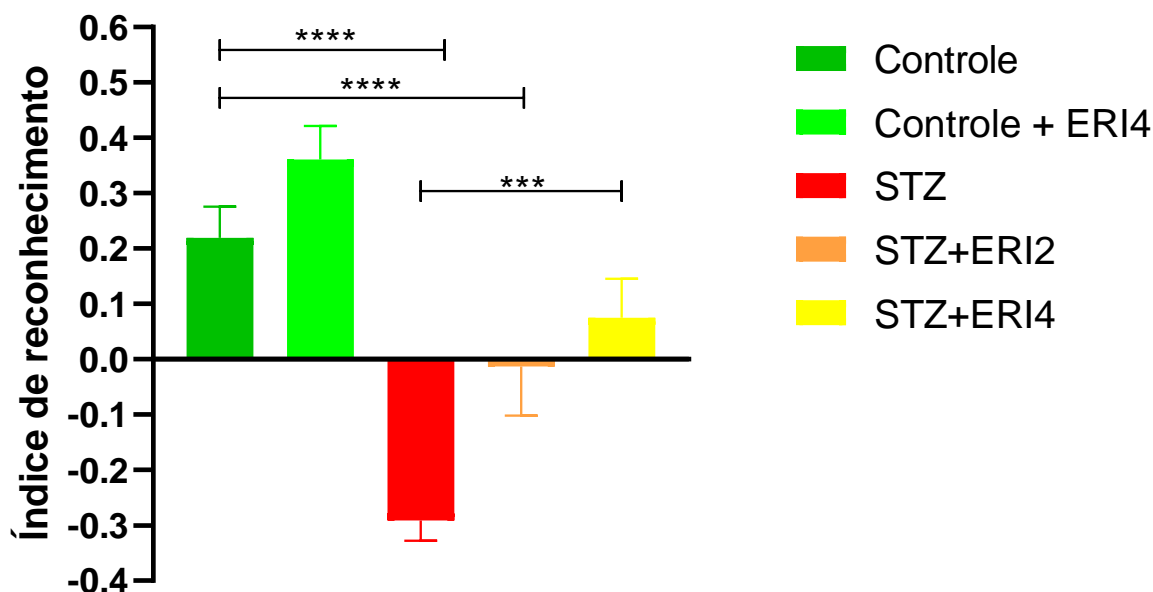
índice de reconhecimento analisado 13 dias após a injeção de STZ, 1h após a apresentação dos objetos (n = 8 - 10 animais/grupo). Os valores estão representados como média \pm EPM e os dados apresentaram normalidade (SHAPIRO- WILK, $p > 0,05$) e por isso foram analisados por ANOVA ONE WAY, seguido do Teste pos hoc de Tukey.

Figura 26 - Efeito do eriodictiol (2 e 4 mg/kg, v.o.) sobre a memória recente (MR) de reconhecimento em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ



Fonte: Elaborada pelo autor. Os valores do índice de reconhecimento no Teste do Reconhecimento de Objetos na memória recente (MR) estão em média \pm EPM. Significância representada por ANOVA de uma via, seguido do Teste pos hoc de Tukey (n = 8 - 10). ns: $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ quando comparado ao grupo STZ. STZ (Streptozotocina); ERI2 (Eriodictiol 2 mg/kg) e ERI4 (Eriodictiol 4 mg/kg).

Figura 27 - Efeito do eriodictiol (2 e 4 mg/kg, v.o.) sobre a memória tardia (MT) de reconhecimento em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ i.c.v



Fonte: Elaborada pelo autor. Os valores do índice de reconhecimento no Teste do Reconhecimento de Objetos na memória tardia (MT) estão em média \pm EPM. Significância representada por ANOVA de uma via, seguido do Teste pos hoc de Tukey (n = 8 - 10). ns: $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ quando comparado ao grupo STZ. STZ (Streptozotocina); ERI2 (Eriodictiol 2 mg/kg) e ERI4 (Eriodictiol 4 mg/kg).

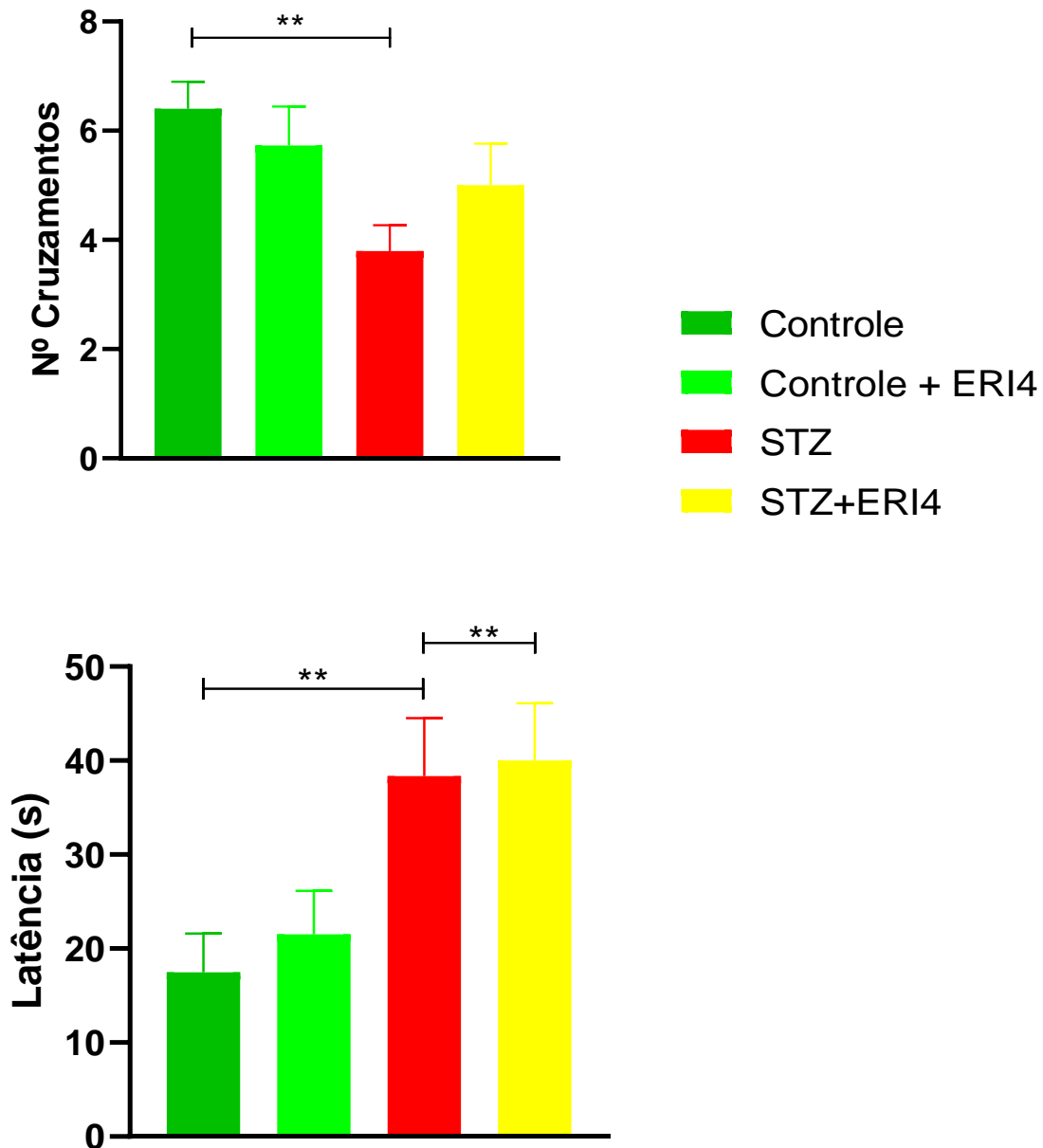
5.1.5 Efeitos do eriodictiol sobre o déficit na memória espacial (Teste do Labirinto Aquático) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ i.c.v

Na avaliação do aprendizado espacial através do labirinto aquático, os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram déficits na memória, demonstrando um maior tempo de latência para encontrar a plataforma quando comparados aos animais do grupo controle (tempo de latência em segundos, Controle: $17,49 \pm 14,88$; STZ: $38,37 \pm 20,35$, $p < 0,01$). O tratamento com o eriodictiol na dose de 4 mg/kg diminuiu significativamente o tempo de latência para encontrar o local da plataforma (tempo de latência em segundos, STZ + ERI 4: $40,04 \pm 22,74$, $p < 0,01$) (Figura 28, gráfico à direita).

Os animais STZ também apresentaram um menor número de cruzamentos no quadrante onde a plataforma estava escondida quando comparados aos animais do grupo controle (Controle: $6,4 \pm 1,92$; STZ: $3,8 \pm 1,82$, $p < 0,01$) (Figura 28, gráfico à esquerda). Os valores estão representados como média \pm EPM e os dados apresentaram normalidade (SHAPIRO- WILK, $p > 0,05$) e por isso foram analisados por ANOVA ONE WAY, seguido do Teste pos hoc de Tukey. O tratamento com o eriodictiol na dose de 4 mg/kg não promoveu

uma melhora significativa no número de cruzamentos para encontrar o local da plataforma (STZ + ERI4: $5 \pm 2,4$) (Figura 28).

Figura 28 - Avaliação da memória espacial (número de cruzamentos e tempo de latência) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ



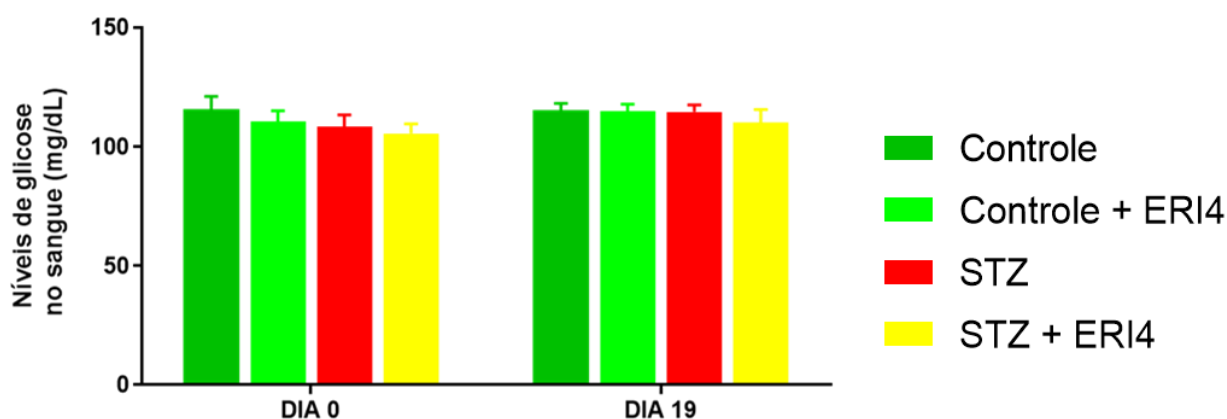
Fonte: Elaborada pelo autor. Os valores do número de cruzamentos e da latência no Teste do Labirinto Aquático (Water Maze) estão em média \pm EPM. Significância representada por ANOVA de uma via, seguido do Teste pos hoc de Tukey ($n = 8 - 10$). ns: $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ quando comparado ao grupo STZ. STZ (Streptozotocina); ERI2 (Eriodictiol 2 mg/kg) e ERI4 (Eriodictiol 4 mg/kg).

5.2 Experimentos *in vitro*

5.2.1 Níveis de glicose no sangue periférico em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ *i.c.v*

Os resultados obtidos dos níveis de glicose no sangue periférico demonstraram que não houve nenhuma alteração na glicemia antes e após os procedimentos de indução com STZ e com o tratamento do eriodictiol nas duas doses testadas (2 e 4 mg/kg, *v.o*), demonstrando que os animais não estavam diabéticos antes da cirurgia e nem ficaram após injeção *i.c.v* com a toxina STZ. O gráfico (Figura 29) mostra que os níveis de glicose não foram alterados em nenhum dos grupos experimentais avaliados neste estudo.

Figura 29 - Efeito do tratamento com eriodictiol sobre a glicemia em camundongos submetidos ao modelo de DAE por STZ



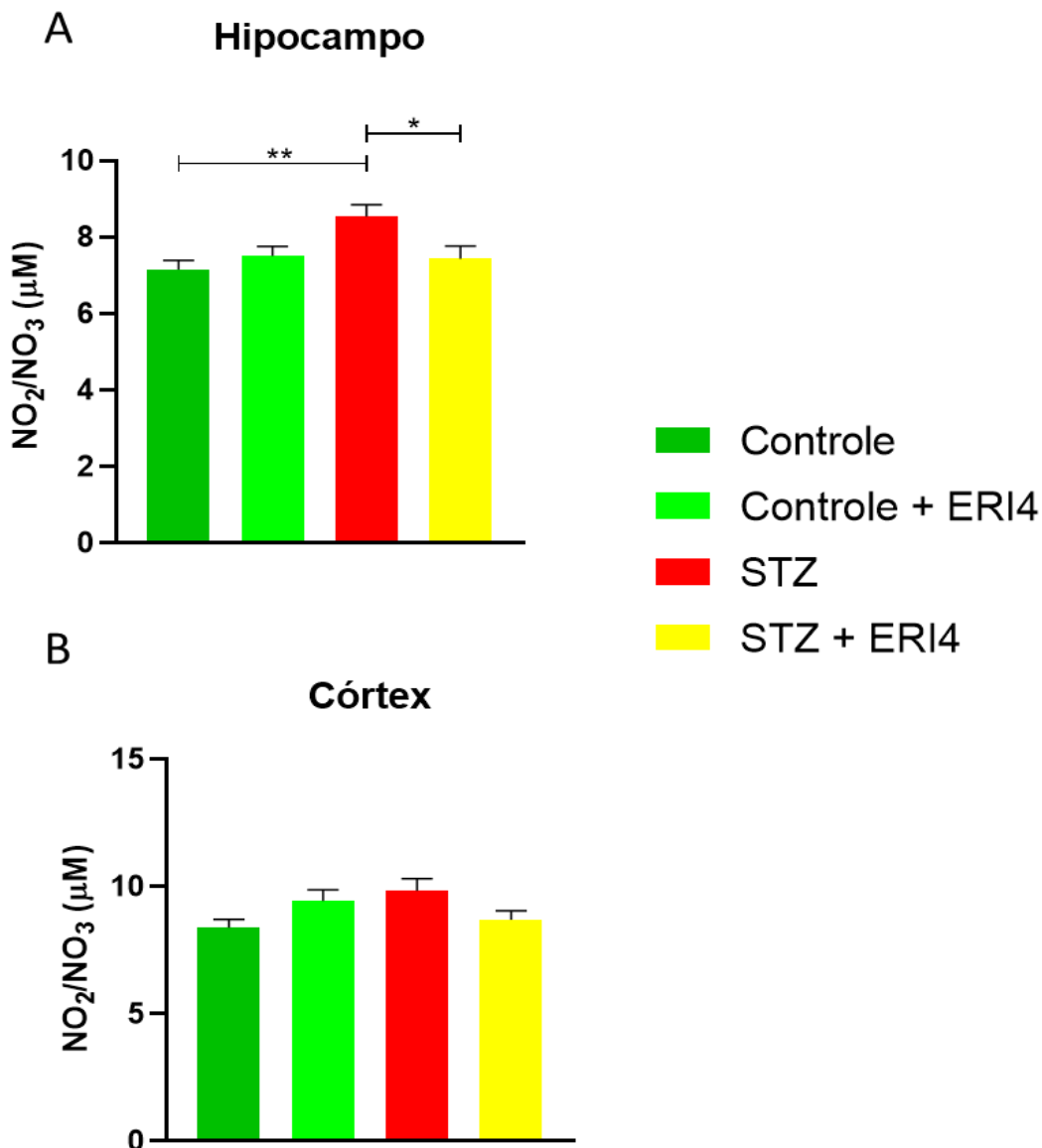
Fonte: Elaborada pelo autor. Os animais foram tratados com eriodictiol (2 e 4 mg/kg, *v.o*) durante 16 dias. A análise dos níveis de glicose no sangue dos camundongos ($n = 8 - 10$ animais/grupo) foi feita nos dias 0° e 19°, antes dos procedimentos de indução e imediatamente antes da eutanásia dos animais utilizando fitas de glicemia. Os valores estão representados como média \pm EPM. Significância por Kruskal-Wallis ($n = 8 - 10$). STZ (Streptozotocina) e ERI4 (Eriodictiol 4 mg/kg).

5.2.2 Efeitos do eriodictiol (4 mg/kg) sobre a dosagem de nitrito/nitrato (NO_2/NO_3) em tecidos cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ *i.c.v*

Na avaliação da dosagem de nitrito/nitrato nos tecidos cerebrais, córtex pré-frontal e hipocampo, os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram um aumento significativo nas concentrações de nitrito no hipocampo (concentração em μM , Controle: 7,16

$\pm 0,58$; STZ: $8,55 \pm 0,76$, $p < 0,01$) (Figura 30A). O tratamento com o eriodictiol foi capaz de diminuir significativamente o aumento da concentração de nitrito no hipocampo (concentração em μM , STZ + ERI 4: $7,43 \pm 0,82$, $p < 0,05$). Não foram demonstradas alterações significativas no córtex (Figura 30B).

Figura 30 - Efeitos do eriodictiol (4 mg/kg, v.o) sobre a dosagem de nitrito/nitrato (NO_2/NO_3) no hipocampo (A) e no córtex pré frontal (B) de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ i.c.v

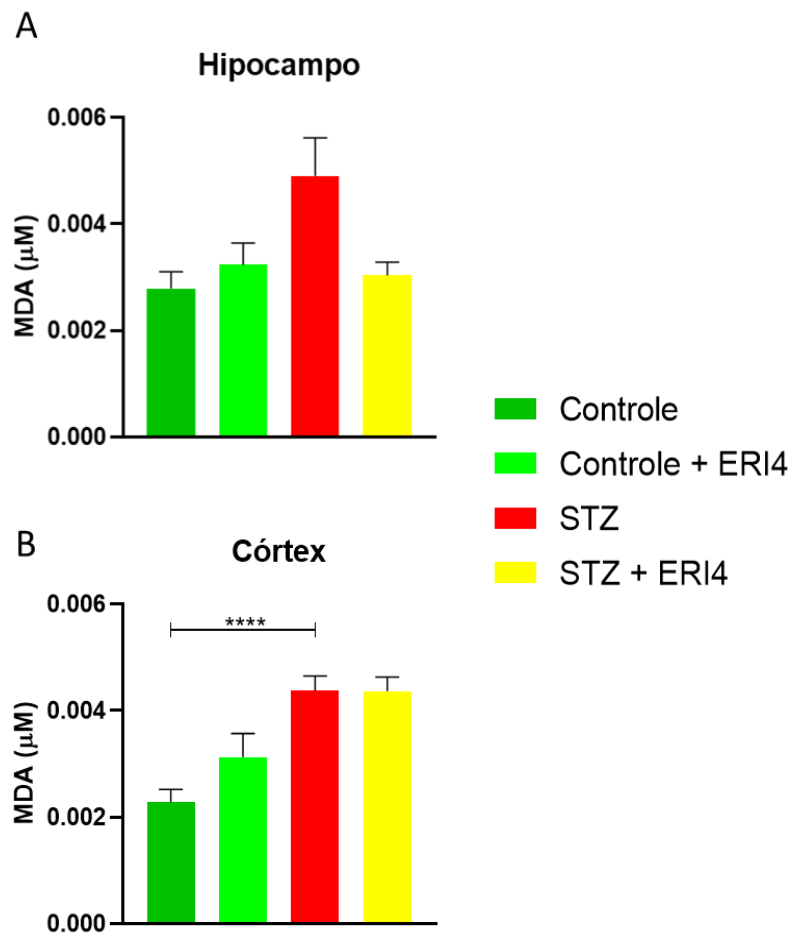


Fonte: Elaborada pelo autor. Os animais foram tratados com eriodictiol (4 mg/kg, v.o.) durante 16 dias, sendo as áreas dissecadas para dosagem de nitrito/nitrato em μM 16 dias após a injeção de STZ ($n = 6$ animais/grupo). Os valores dos níveis de nitrito/nitrato estão representados como média \pm EPM. Significância representada por Kruskal-Wallis e Teste de Dunn's ($n = 6$). ns: $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ quando comparado ao grupo STZ. STZ (Streptozotocina) e ERI4 (Eriodictiol 4 mg/kg).

5.2.3 Efeitos do eriodictiol (4 mg/kg) sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em tecidos cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ i.c.v

Na avaliação da dosagem de MDA no córtex pré-frontal e no hipocampo, os animais submetidos às injeções de STZ i.c.v apresentaram um aumento significativo nas concentrações de MDA no córtex pré-frontal (concentrações de MDA em μM , Controle: $0,00228 \pm 0,000847$; STZ: $0,004376 \pm 0,00087$, $p < 0,05$ (Figura 31B). O tratamento com o eriodictiol na dose de 4 mg/kg, v.o, não foi capaz de diminuir significativamente o aumento da concentração de MDA em ambas as áreas cerebrais (Figura 31).

Figura 31 - Efeitos do eriodictiol (4 mg/kg, v.o) sobre a peroxidação lipídica (TBARS) no hipocampo e no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ

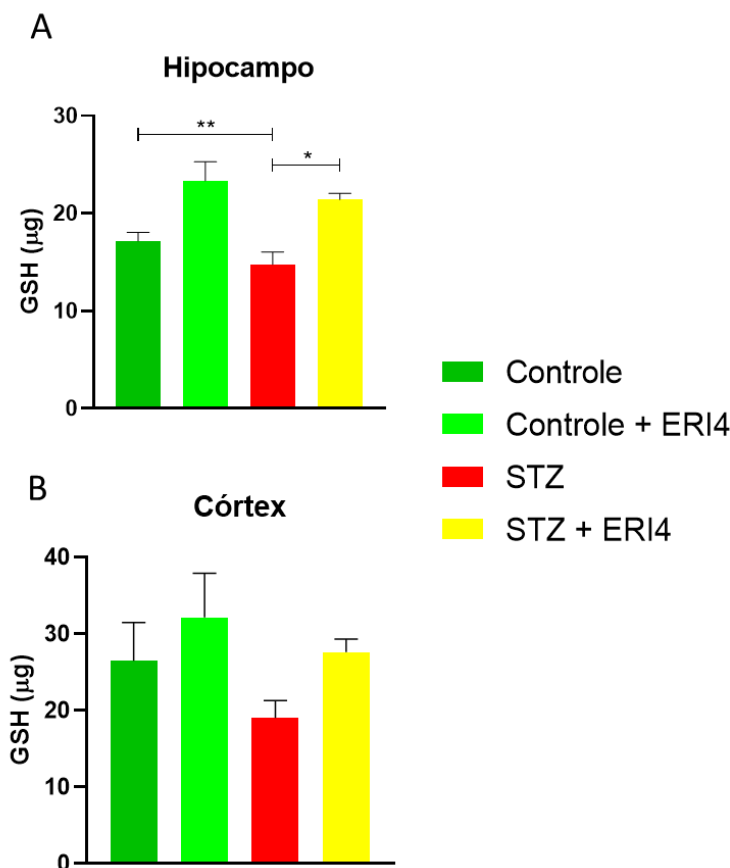


Fonte: Elaborada pelo autor. Os animais foram tratados com eriodictiol (4 mg/kg, v.o.) durante 16 dias, sendo as áreas dissecadas para dosagem de peroxidação lipídica em μM 16 dias após a injeção de STZ (n = 6 animais/grupo). Os valores dos níveis de MDA estão representados como média \pm EPM. Significância representada por ANOVA de uma via, seguido do Teste pos hoc de Tukey (n = 6). ns: $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ quando comparado ao grupo STZ. STZ (Streptozotocina) e ERI4 (Eriodictiol 4 mg/kg).

5.2.4 Efeitos do eriodictiol (4 mg/kg, v.o) sobre a Glutathiona Reduzida (GSH) em tecidos cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ

Na avaliação da dosagem de GSH no córtex pré-frontal e no hipocampo, os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram uma redução significativa nas concentrações de GSH no hipocampo (concentrações de GSH em μM , Controle: $17,15 \pm 2,04$; STZ: $14,77 \pm 3,09$, $p < 0,01$) (Figura 32). O tratamento com o eriodictiol na dose de 4 mg/kg, v.o foi capaz de prevenir significativamente a redução das concentrações de GSH no hipocampo (STZ + ERI 4: $21,02 \pm 1,36$, $p < 0,05$) (Figura 32A). Não foram demonstradas alterações significativas no córtex, mas uma tendência de redução de GSH por STZ e de proteção com eriodictiol.

Figura 32 - Efeitos do eriodictiol (4 mg/kg, v.o) sobre a Glutathiona Reduzida (GSH) no hipocampo e no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ

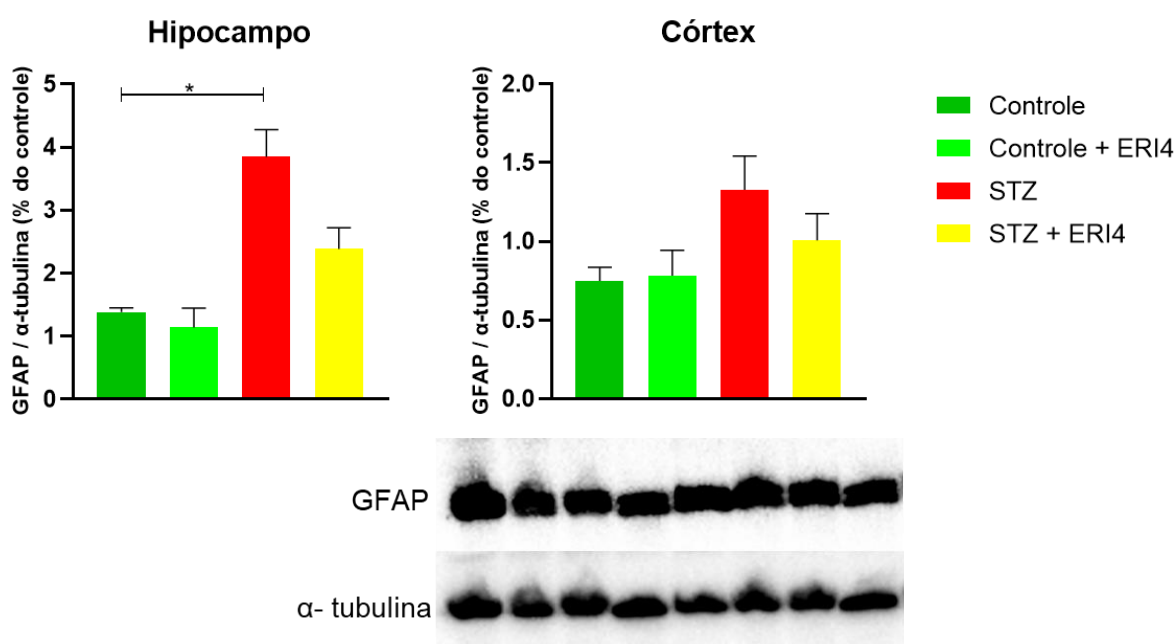


Fonte: Elaborada pelo autor. Os animais foram tratados com eriodictiol (4 mg/kg, v.o.) durante 16 dias, sendo as áreas dissecadas para dosagem de GSH em μM 16 dias após a injeção de STZ ($n = 6$ animais/grupo). Os valores estão representados como média \pm EPM. Significância representada por ANOVA de uma via, seguido do Teste pos hoc de Tukey ($n = 6$). ns: $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ quando comparado ao grupo STZ. STZ (Streptozotocina) e ERI4 (Eriodictiol 4 mg/kg).

5.2.5 Efeitos do eriodictiol sobre a imunorreatividade de GFAP através da técnica de Western-blot em tecidos cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ i.c.v

Foi demonstrado que houve aumento significativo na imunorreatividade de GFAP no hipocampo dos animais submetidos às injeções de STZ (Relação GFAP/ α -Tubulina, % do controle) (Controle: $1,386 \pm 0,06553$; STZ: $3,85 \pm 0,4265$, $p < 0,05$) (Figura 33). O tratamento com o eriodictiol na dose de 4 mg/kg, v.o, não reduziu significativamente a expressão de GFAP no hipocampo (STZ + ERI 4: $2,384 \pm 0,3394$, $p > 0,05$) e no córtex pré-frontal (STZ + ERI 4: $1,007 \pm 0,1684$, $p < 0,1$). Não foram demonstradas alterações significativas no córtex pré-frontal, mas uma tendência de aumento de GFAP com STZ e de proteção com eriodictiol.

Figura 33 - Expressão de GFAP avaliada por Western blotting no hipocampo e no córtex pré-frontal de camundongos tratados com eriodictiol (4 mg/kg, v.o) após as injeções de STZ i.c.v

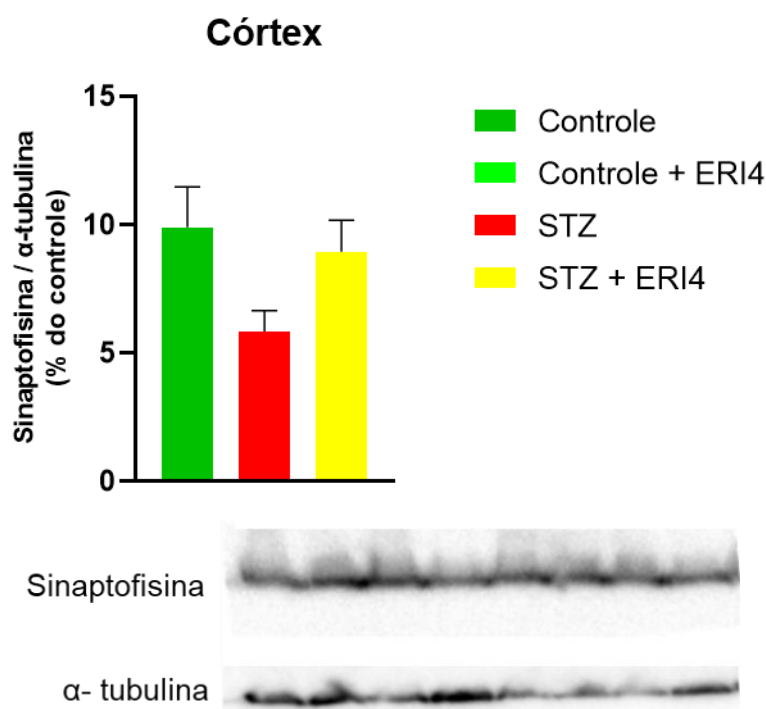


Fonte: Elaborada pelo autor. Os animais foram tratados com eriodictiol (4 mg/kg, v.o.) durante 16 dias, sendo as áreas dissecadas para o preparo das amostras para quantificação de GFAP, 16 dias após a injeção de STZ (n = 6 animais/grupo). Os valores estão representados como média \pm EPM. * $< 0,05$ vs. STZ + V. Significância por Kruskal-Wallis e Teste de Dunn's (n = 6). GFAP: A proteína ácida fibrilar glial; STZ (Streptozotocina) e ERI4 (Eriodictiol 4 mg/kg).

5.2.6 Efeitos do eriodictiol sobre a imunorreatividade de sinaptofisina através da técnica de Western-blot em tecidos cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ i.c.v

A análise por Western blot demonstrou que a expressão de sinaptofisina (37 kDa) diminuiu no córtex pré-frontal após as injeções de STZ (Relação sinaptofisina/ α -Tubulina, % do controle) (Controle: $9,907 \pm 1,575$; STZ: $5,845 \pm 0,8156$, $p < 0,05$) e que o tratamento com o eriodictiol na dose de 4 mg/kg, v.o aumentou a expressão de sinaptofisina, mas os dados não foram significativos (STZ + ERI 4: $8,953 \pm 1,227$, $p > 0,05$) (Figura 34).

Figura 34 - Expressão de sinaptofisina avaliada por Western blotting no córtex pré-frontal de camundongos tratados com eriodictiol (4 mg/kg, v.o)



Fonte: Elaborada pelo autor. Os animais foram tratados com eriodictiol (4 mg/kg, v.o.) durante 16 dias, sendo as áreas dissecadas para o preparo das amostras para quantificação de sinaptofisina (SYN), 16 dias após a injeção de STZ (n = 6 animais/grupo). Os valores estão representados como média \pm EPM. * $< 0,05$ vs. STZ + V. Significância por ANOVA de uma via, seguido do Teste pos hoc de Tukey (n = 6). STZ (Streptozotocina) e ERI4 (Eriodictiol 4 mg/kg).

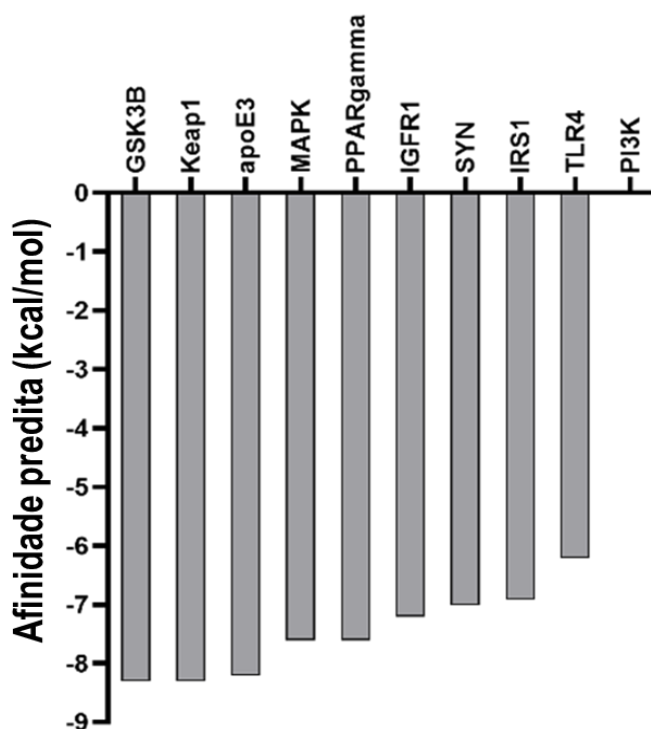
5.3 Experimentos *in silico*

Os experimentos *in silico* foram realizados objetivando a avaliação da atividade do eriodictiol e foram conduzidos em parceria com a FIOCRUZ- Ce, no Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional em Biofármacos, sob a supervisão do Professor João Hermínio Martins da Silva.

5.3.1 Identificação de possíveis alvos do eriodictiol

A busca resultou na obtenção de dez alvos proteicos de interesse. A realização do *docking* cego ranqueou, de forma qualitativa, o potencial de interação destas ao eriodictiol (Figura 35). IRS-1, GSK3B e Keap1 tiveram valores de afinidade predita similares, -6,9 kcal, -8,3 e -8,3 kcal/mol, respectivamente, sendo selecionados para as avaliações subsequentes de suas cavidades, *docking* dirigido e dinâmica molecular.

Figura 35 - Afinidade predita pelo docking cego do eriodictiol a dez potenciais alvos proteicos



Fonte: Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional em Biofármacos

5.3.2 Efeitos do eriodictiol sobre IRS1

5.3.2.1 Docking cego do eriodictiol ao IRS1

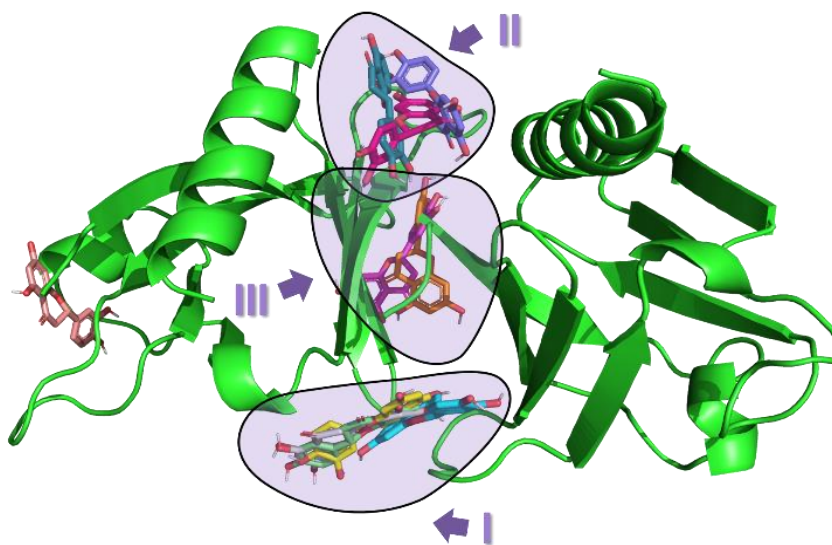
O *docking* cego foi realizado como uma das ferramentas para identificar o sítio de interação mais provável do eriodictiol ao IRS1, onde foi observado que o eriodictiol interage prioritariamente em três regiões (Figura 36 e Tabela 6).

Tabela 6 - Interação entre IRS1 e eriodictiol. Energia (kcal/mol) de cada pose

Pose	Afinidade (kcal/mol)
1	-6.9
2	-6.9
3	-6.8
4	-6.7
5	-6.6
6	-6.4
7	-6.4
8	-6.3
9	-6.2
10	-6.2

Fonte: Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional em Biofármacos

Figura 36 - Localização das três regiões de interação entre IRS1 e eriodictiol. Visualização tridimensional da estrutura pelo programa PyMOL com as três regiões de afinidade do eriodictiol em destaque



Fonte: PyMol

5.3.2.2 Busca por cavidades drogáveis em IRS1

A busca por cavidades drogáveis foi realizada para complementar o resultado das regiões de interação identificadas pelo *docking* cego. O servidor DoGSiteScorer foi utilizado para prever, caracterizar e comparar as características biofísicas das cavidades presentes na estrutura cristalográfica de IRS1. O programa conseguiu identificar, ao todo, cinco regiões de interação na estrutura de IRS1 e, notadamente, o sítio P_0 foi o mais bem ranqueado. Tal sítio sobrepõe-se às regiões 2 e 3, identificadas pelo *docking* cego. Já o sítio P_1, classificado em segundo lugar, sobrepõe-se à região 1 (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados obtidos pelos preditores de cavidade DogSiteScorer para análise de cavidades de IRS1. Na tabela estão os valores da análise dos descritores relacionados a tamanho, profundidade, drogabilidade e composição de aminoácidos pertencentes ao IRS1

Cavidade	Superfície (Å²)	Volume (Å³)	Profundidade (Å)	Abertura	Escore simples	Escore de drogabilidade	Composição de aminoácidos			
							Fração apolar	Fração polar	Fração positiva	Fração negativa
P_0	989,6	859,0	17,3	0,17	0,60	0,81	0,55	0,17	0,17	0,10
P_1	594,5	370,7	16,7	0,17	0,21	0,70	0,35	0,35	0,15	0,15
P_2	645,0	360,0	13,7	0,15	0,18	0,62	0,42	0,21	0,21	0,16
P_3	523,3	264,6	16,0	0,31	0,10	0,65	0,53	0,27	0,13	0,07
P_4	383,0	216,1	12,2	0,21	0,07	0,46	0,40	0,47	0,00	0,13

Fonte: Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional em Biofármacos

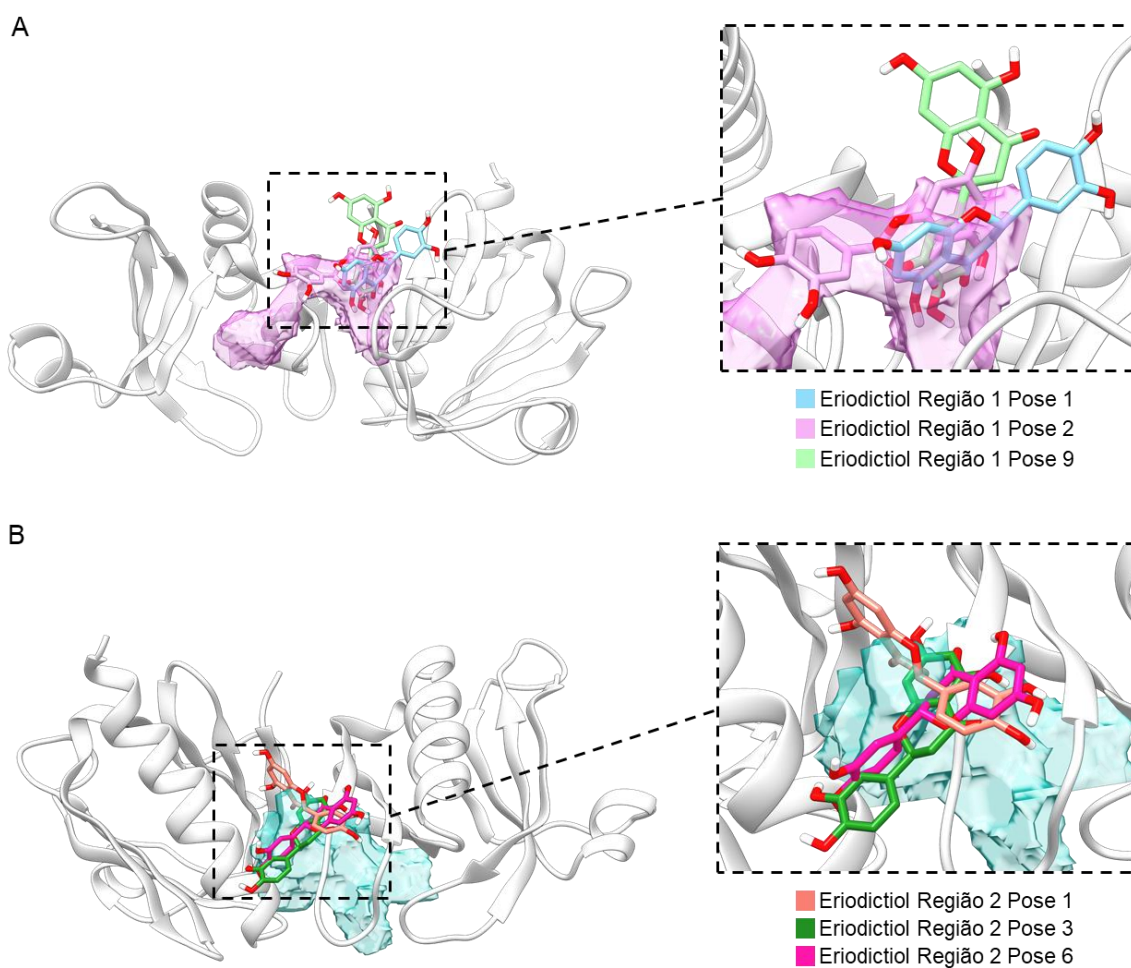
O resultado da predição com P2Rank confirmou aqueles obtidos pelo *docking* cego e pelo DoGSiteScorer, com a cavidade mais bem ranqueada pelo P2Rank (Tabela 8) sobrepondo-se as cavidades P_0 e P_1, que obtiveram os melhores resultados de drogabilidade no DoGSiteScorer. A consonância dos resultados obtidos por diferentes métodos preditivos reforça esta localização como a principal região do IRS1 para interação com o eriodictiol (Figura 37).

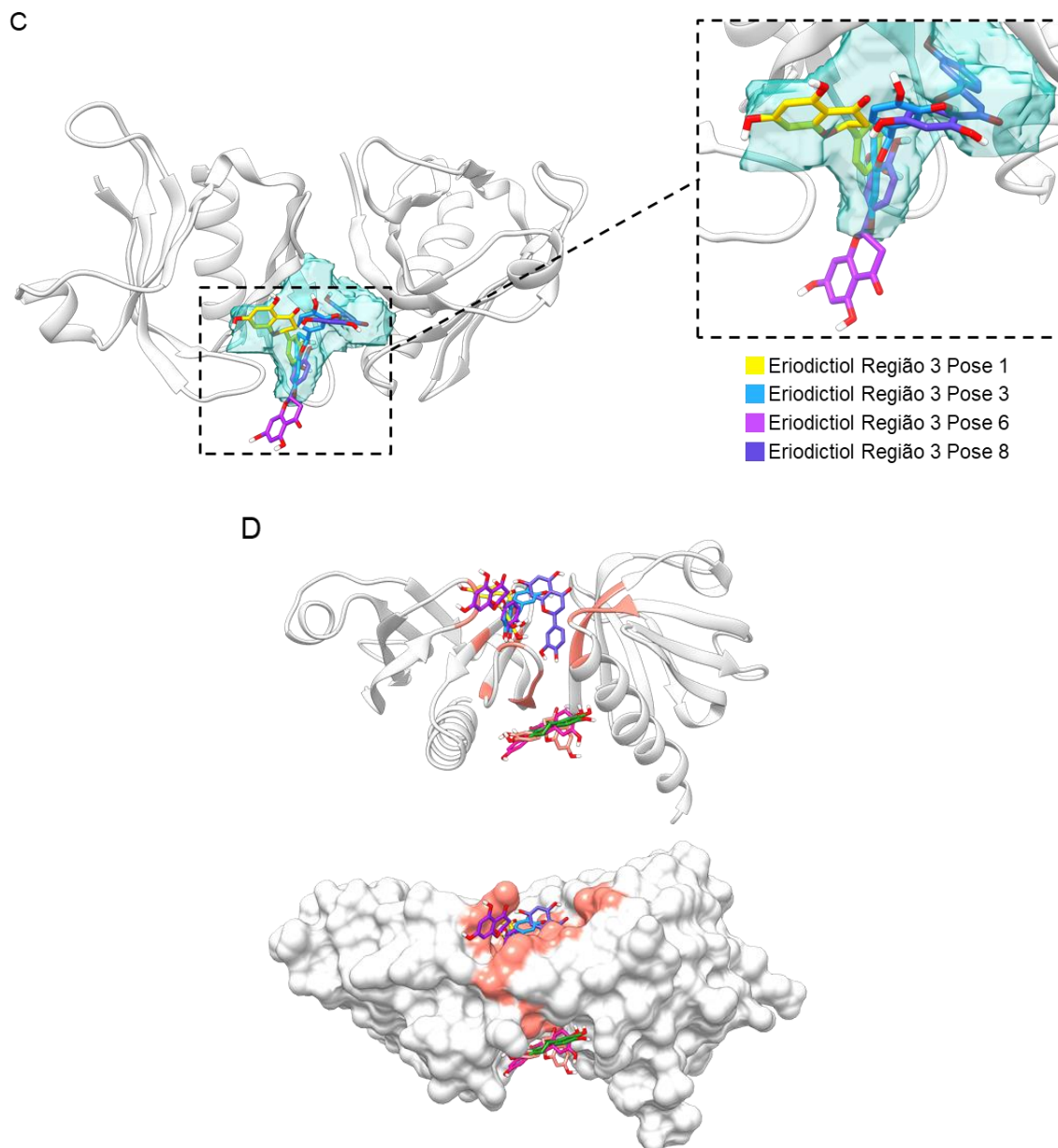
Tabela 8 - Resultados obtidos pelos preditores de cavidade P2Rank para análise de cavidades de IRS1

Ranking	Escore da cavidade	Escore de probabilidade
1	11,53	0,438
2	2,10	0,022
3	1,70	0,012
4	1,51	0,009

Fonte: Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional em Biofármacos. Na tabela estão os valores da análise do ranqueamento das quatro cavidades detectadas pelo P2Rank pertencentes ao IRS1.

Figura 37 - Resultados obtidos pelos preditores de cavidade DogSiteScorer e P2Rank para análise de cavidades de IRS1





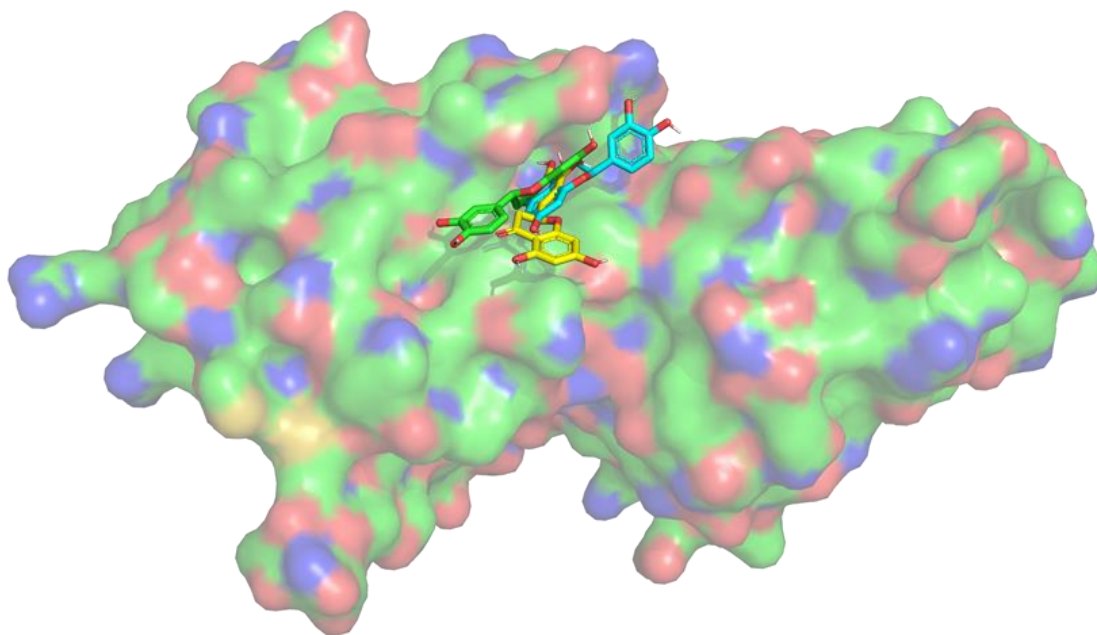
Fonte: Chimera. A) Sobreposição das poses de *docking* da região 1 com a cavidade P_1. B) Sobreposição das poses de *docking* da região 2 com a cavidade P_0. C) Sobreposição das poses de *docking* da região 3 com a cavidade P_0. A numeração das regiões é a mesma dada após a realização do *docking* cego. D) Superfície de IRS1, com a região mais bem ranqueada pelo P2Rank está colorida em rosa.

5.3.2.3 Docking Dirigido do eriodictiol ao IRS1

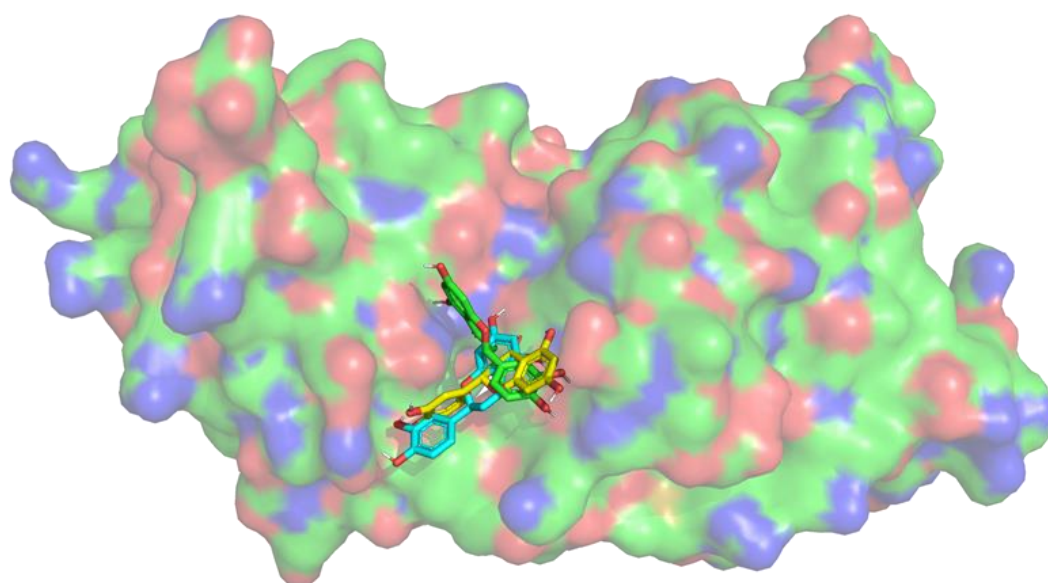
O *docking* dirigido foi realizado para fornecer uma previsão mais acurada do modo de ligação do eriodictiol nos sítios de interação preditos anteriormente na superfície de IRS1. Foram identificadas dez poses de interação do eriodictiol para cada uma das três regiões do receptor de insulina tipo 1 (IRS1) observadas no *docking* cego (Figura 38).

Figura 38 - Interação entre IRS1 e eriodictiol com a visualização tridimensional da superfície da proteína e das poses do ligante pelo programa PyMOL. A) Região 1. B) Região 2. C) Região 3. A representação de superfície da proteína está colorida de acordo com os átomos (carbonos em verde, oxigênios em vermelho e nitrogênios em azul)

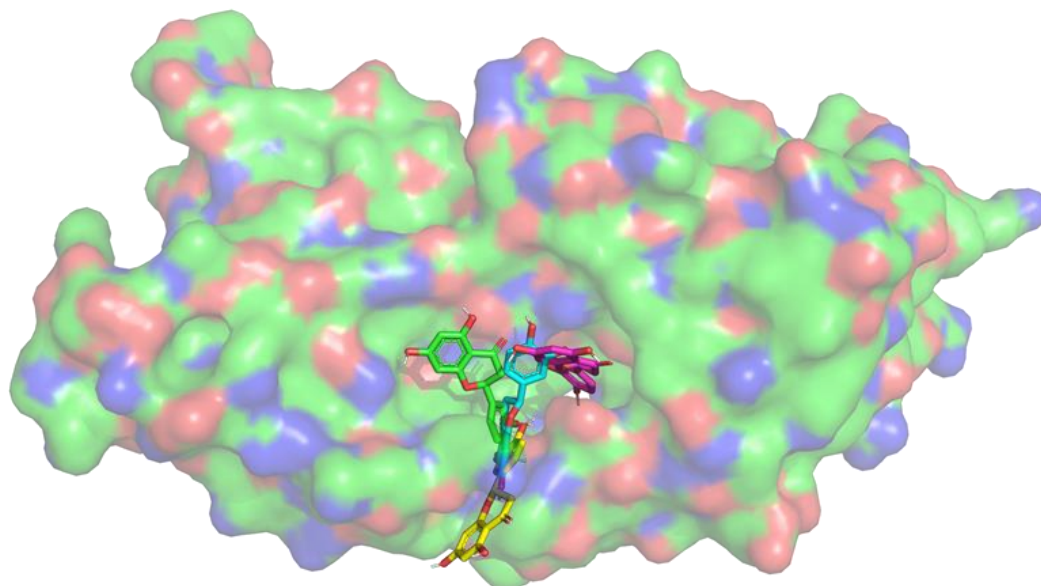
A



B



C



Fonte: PyMol

Foram selecionados, respectivamente, três, três e quatro modos de ligação das regiões 1, 2 e 3 para avaliação por simulação de dinâmica molecular, levando em consideração os menores valores de afinidade e a diversidade conformacional no sítio (Tabela 9).

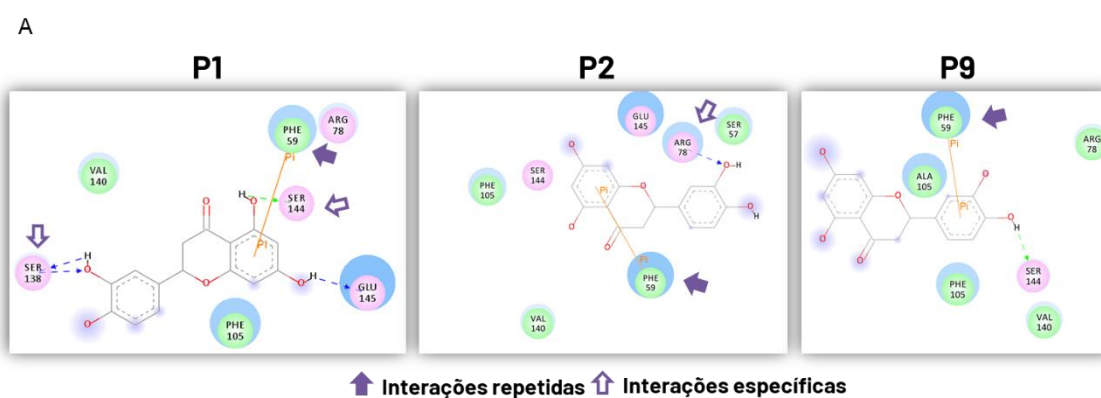
Tabela 9 - Interação entre IRS1 e eriodictiol com a afinidade (kcal/mol) de cada pose. Os modos de ligação destacados em verde, azul, amarelo e roxo foram aqueles selecionados para passarem por simulações de dinâmica molecular

REGIÃO I	Pose	Energia (kcal/mol)	REGIÃO II	Pose	Energia (kcal/mol)	REGIÃO III	Pose	Energia (kcal/mol)
	1	-6.9		1	-6.5		1	-6.9
2	-6.8	2	-6.0	2	-6.7			
3	-6.6	3	-5.9	3	-6.4			
4	-6.5	4	-5.9	4	-6.4			
5	-6.3	5	-5.8	5	-6.3			
6	-6.3	6	-5.8	6	-6.1			
7	-6.3	7	-5.8	7	-6.1			
8	-6.2	8	-5.7	8	-6.1			
9	-6.2	9	-5.7	9	-5.9			
10	-6.1	10	-5.7	10	-5.9			

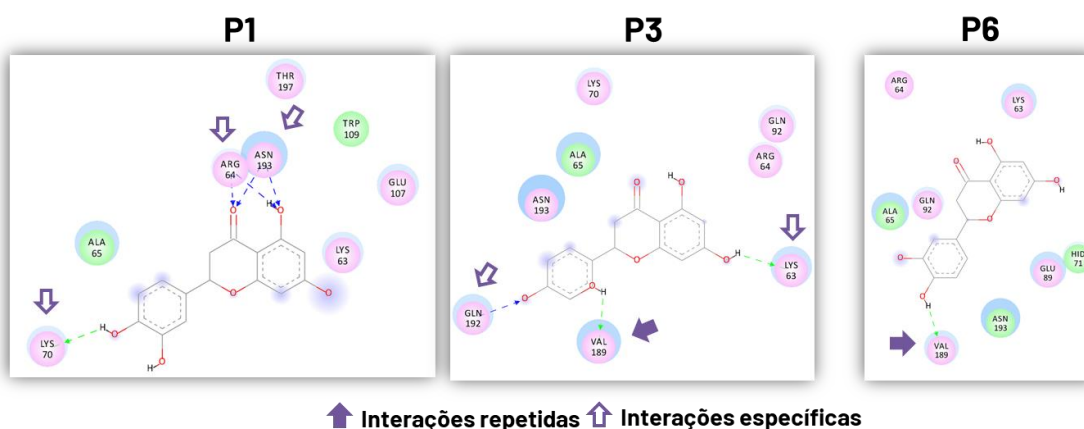
Fonte: Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional em Biofármacos. As linhas coloridas em verde, azul, amarelo e roxo representam, respectivamente, cada pose do eriodictiol na figura 38.

Todas as poses da região 1 foram ancoradas por interações do tipo π - π stacking entre um dos anéis aromáticos presentes na estrutura do eriodictiol e a cadeia lateral da Phe59 de IRS1. A região 2 não apresentou interações recorrentes nas três poses selecionadas, mas, na região 3, a Lys68 interagiu com o ligante em três dos quatro modos de ligação escolhidos (Figura 39).

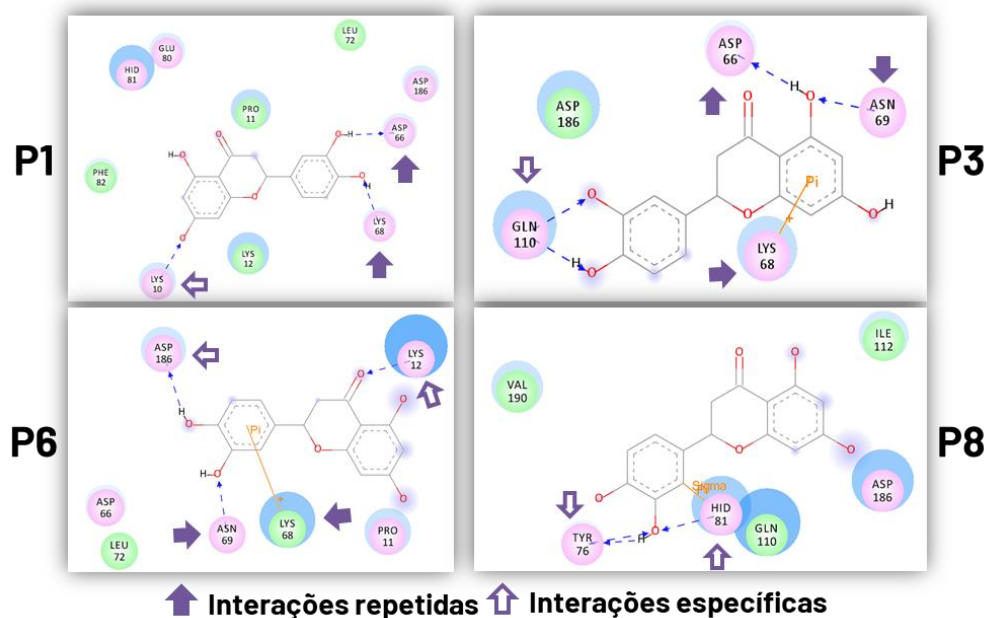
Figura 39 - Diagrama 2D de interações do eriodictiol com IRS1 na (A) Região I, (B) Região 2 e (C) Região 3



B



C



Fonte: Discovery Studios. As setas pontilhadas em azul e verde representam ligações de hidrogênio

5.3.3.4 Dinâmica molecular dos complexos eriodictiol/IRS1

Simulações de dinâmica molecular (DM) são comumente utilizadas para avaliar os complexos obtidos através do procedimento de *docking*, uma vez que os modos de ligação preditos, que se assemelham a conformação nativa do ligante, tendem a se manter estáveis na pose de *docking* ou a convergirem para uma conformação mais favorável ao longo da simulação, a passo de que poses distantes da conformação experimental tendem a apresentar um comportamento instável ou até mesmo evadirem o sítio de interação (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006 e CAVALLI *et al.*, 2004).

Dessa forma, o total de dez poses selecionadas nas três regiões de IRS1 foram submetidas às simulações de DM de 50 ns em triplicata. A estabilidade do ligante nos sítios foi avaliada pelo RMSD em relação a estrutura inicial (pose de *docking*) e valores médios acima de 5 Å em pelo menos uma das replicatas indicam instabilidade da pose proposta.

Evidenciou-se que nenhuma das poses testadas manteve valores de RMSD abaixo do valor de corte de 5 Å nas três replicatas (Tabela 10). Além disso, a análise das conformações finais das replicatas não indicam a ocorrência de convergência entre as simulações. Tais resultados apontam para o não reconhecimento apropriado da molécula pela proteína IRS1 (Figura 40).

Tabela 10 - Dinâmica molecular de complexos eriodictiol/IRS1. As tabelas incluem o RMSD médio e os valores mínimo e máximo de RMSD para cada replicata de cada pose simulada

REGIÃO 1 – POSE 1	R1	R2	R3
Média RMSD ligante (Å)	6,32	19,92	3,46
RMSD primeiro frame ligante (Å)	3,39	2,49	3,53
RMSD último frame ligante (Å)	7,98	26,61	3,35
Mínimo RMSD Ligante (Å)	0,84	1,13	1,32
Máximo RMSD Ligante (Å)	14,02	28,81	7,69

REGIÃO 1 – POSE 2	R1	R2	R3
Média RMSD ligante (Å)	13,98	9,20	31,18
RMSD primeiro frame ligante (Å)	7,01	8,96	6,48
RMSD último frame ligante (Å)	33,19	10,54	17,54
Mínimo RMSD Ligante (Å)	3,55	7,11	6,14
Máximo RMSD Ligante (Å)	39,02	15,51	69,08

REGIÃO 1 – POSE 9	R1	R2	R3
Média RMSD ligante (Å)	24,58	4,00	20,52
RMSD primeiro frame ligante (Å)	8,41	4,67	17,30
RMSD último frame ligante (Å)	16,46	4,88	31,24
Mínimo RMSD Ligante (Å)	7,35	0,90	15,43
Máximo RMSD Ligante (Å)	72,17	8,27	32,55

REGIÃO 2 – POSE 1	R1	R2	R3
Média RMSD ligante (Å)	22,55	12,72	6,26
RMSD primeiro frame ligante (Å)	10,01	5,50	2,23
RMSD último frame ligante (Å)	22,68	13,21	16,31
Mínimo RMSD Ligante (Å)	4,55	4,97	1,25
Máximo RMSD Ligante (Å)	70,35	17,66	17,02

REGIÃO 2 – POSE 3	R1	R2	R3
Média RMSD ligante (Å)	15,19	6,82	8,74
RMSD primeiro frame ligante (Å)	3,39	3,63	8,06
RMSD último frame ligante (Å)	25,05	7,39	34,91
Mínimo RMSD Ligante (Å)	2,10	3,14	3,49
Máximo RMSD Ligante (Å)	36,66	13,84	36,40

REGIÃO 2 – POSE 6	R1	R2	R3
Média RMSD ligante (Å)	7,89	18,85	6,92
RMSD primeiro frame ligante (Å)	7,65	2,13	3,39
RMSD último frame ligante (Å)	7,97	49,07	7,25
Mínimo RMSD Ligante (Å)	4,54	0,98	2,48
Máximo RMSD Ligante (Å)	13,06	72,77	11,06

REGIÃO 3 – POSE 1	R1	R2	R3
Média RMSD ligante (Å)	3,22	17,66	2,33
RMSD primeiro frame ligante (Å)	1,59	4,28	1,74
RMSD último frame ligante (Å)	3,34	21,62	2,89
Mínimo RMSD Ligante (Å)	0,61	4,09	1,15
Máximo RMSD Ligante (Å)	5,23	25,26	4,58

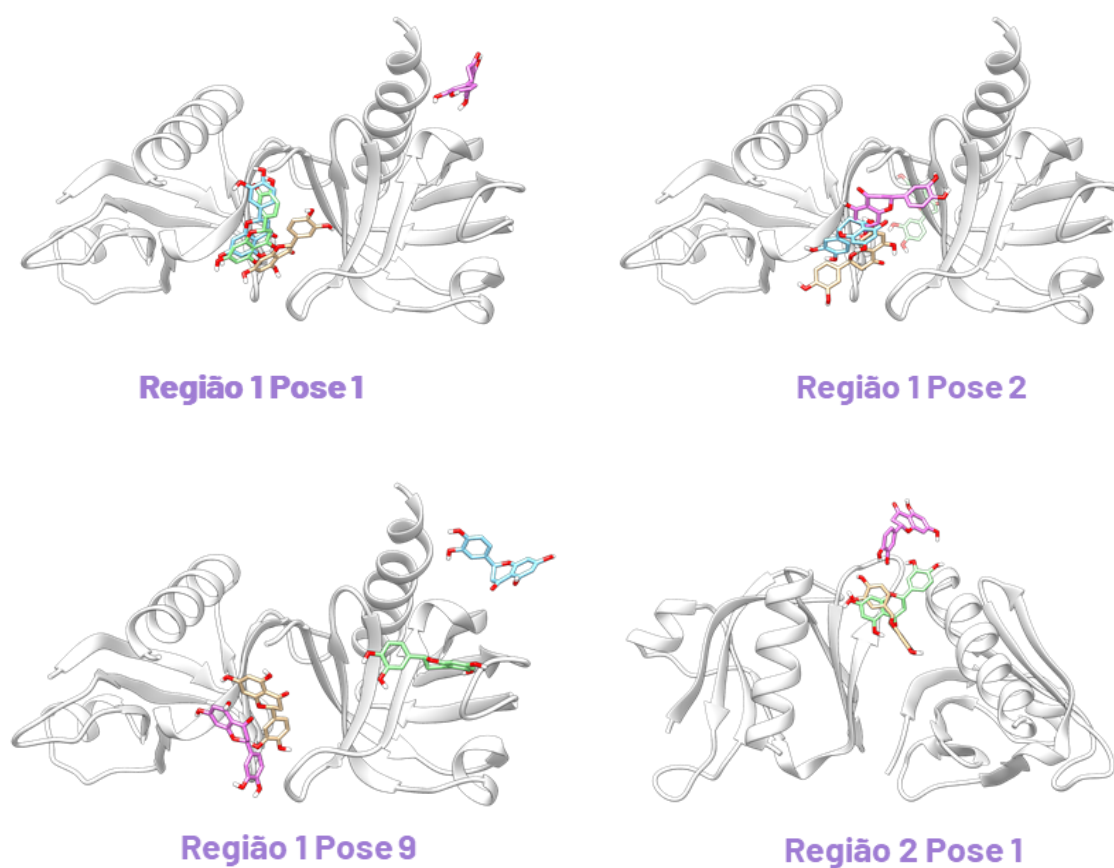
REGIÃO 3 – POSE 3	R1	R2	R3
Média RMSD ligante (Å)	15,83	15,89	37,62
RMSD primeiro frame ligante (Å)	3,57	16,72	11,37
RMSD último frame ligante (Å)	41,40	13,81	46,26
Mínimo RMSD Ligante (Å)	1,33	9,90	10,30
Máximo RMSD Ligante (Å)	59,47	22,30	66,27

REGIÃO 3 – POSE 6	R1	R2	R3
Média RMSD ligante (Å)	8,08	31,75	9,95
RMSD primeiro frame ligante (Å)	4,70	11,83	4,68
RMSD último frame ligante (Å)	10,26	28,26	10,66
Mínimo RMSD Ligante (Å)	1,21	6,44	1,79
Máximo RMSD Ligante (Å)	11,43	70,30	18,08

REGIÃO 3 – POSE 8	R1	R2	R3
Média RMSD ligante (Å)	6,68	7,41	4,14
RMSD primeiro frame ligante (Å)	3,11	4,46	2,54
RMSD último frame ligante (Å)	5,74	6,98	3,98
Mínimo RMSD Ligante (Å)	1,61	3,85	1,86
Máximo RMSD Ligante (Å)	9,78	11,75	5,95

Fonte: Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional em Biofármacos

Figura 40 - Dinâmica molecular de complexos eriodictiol/IRS1 nas conformações finais de cada replicata

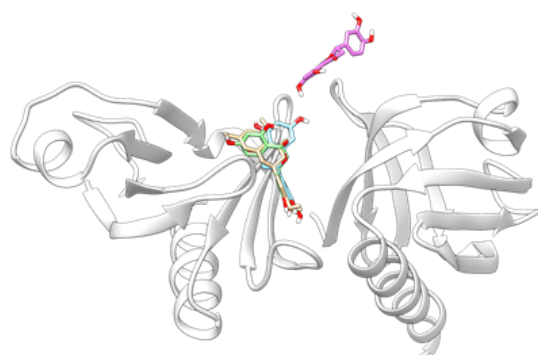




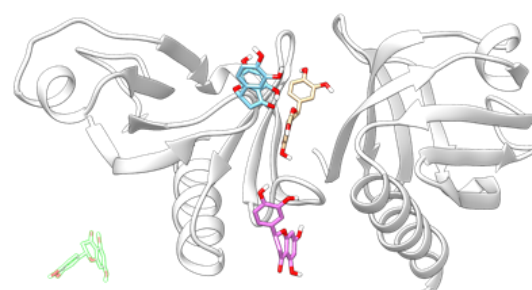
Região 2 Pose 3



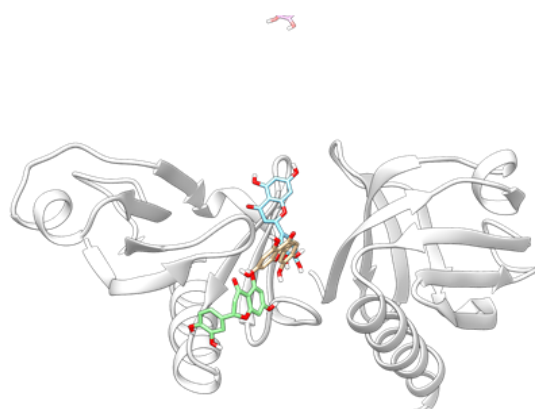
Região 2 Pose 6



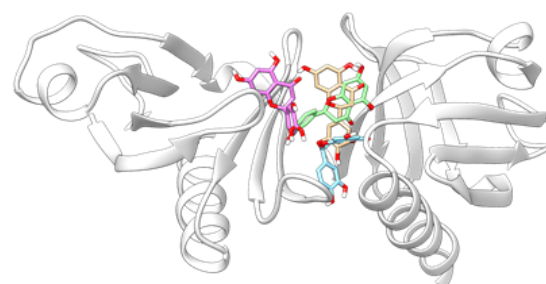
Região 3 Pose 1



Região 3 Pose 3



Região 3 Pose 6



Região 3 Pose 8

Fonte: Chimera. A estrutura secundária de IRS1 (branco) com as poses de docking (colorido).

5.3.3 Efeitos do eriodictiol sobre GSK3 β

5.3.3.1 Docking cego do eriodictiol ao GSK3 β

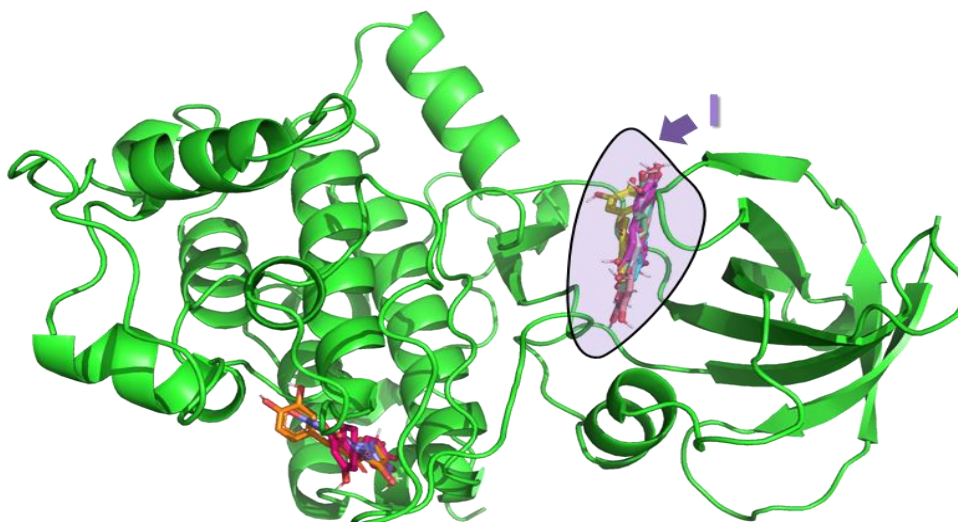
A molécula do eriodictiol interagiu em duas regiões de GSK3 β (Figura 41 e Tabela 11). Entretanto, visto a presença da informação experimental (KIM et al., 2018) sobre sítio de interação do flavonoide morina no cristal de GSK3 β (PDB ID: 6AE3), a cavidade na qual a morina interage foi priorizada para os testes com o eriodictiol (Figura 41- I).

Tabela 11 - Interação entre GSK3 β e eriodictiol. Energia (kcal/mol) de cada pose

Pose	Afinidade (kcal/mol)
1	-8.3
2	-8.0
3	-8.0
4	-7.9
5	-7.9
6	-7.8
7	-7.7
8	-7.6
9	-7.6
10	-7.6

Fonte: Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional em Biofármacos

Figura 41 - Localização das regiões de interação entre GSK3 β e eriodictiol. Visualização tridimensional da estrutura pelo programa PyMOL apontando a região (I) priorizada para os testes subsequentes



Fonte: PyMOL

5.3.3.2 Busca por cavidades drogáveis em GSK3 β

A predição de cavidades simultaneamente pelos servidores DoGSiteScorer e P2Rank GSK3 β objetivou complementar o resultado do docking cego e caracterizar a cavidade descrita como região 1 (Tabela 12). O primeiro programa conseguiu identificar, ao todo, cinco regiões de interação na estrutura de GSK3 β . Apesar de P_0 não ter obtido o melhor valor de drogabilidade, outros índices, como o volume e a pontuação simples, levaram ao seu ranqueamento em primeiro lugar.

Tabela 12 - Resultados obtidos pelos preditores de cavidade DogSiteScorer para análise de cavidades de GSK3 β . Na tabela estão os valores da análise dos descritores relacionados a tamanho, profundidade, drogabilidade e composição de aminoácidos pertencentes ao GSK3 β

Cavidade	Superfície (Å ²)	Volume (Å ³)	Profundidade (Å)	Abertura	Escore simples	DrugScore	Composição de aminoácidos			
							Fração apolar	Fração polar	Fração positiva	Fração negativa
P_0	696,1	644,1	19,2	0,15	0,39	0,82	0,48	0,19	0,16	0,16
P_1	888,4	578,9	23,8	0,17	0,39	0,86	0,36	0,45	0,09	0,09
P_2	953,5	572,5	23,0	0,12	0,38	0,85	0,47	0,38	0,12	0,03
P_3	473,7	291,8	12,5	0,18	0,19	0,54	0,47	0,37	0,11	0,05
P_4	392,9	288,8	12,6	0,26	0,14	0,52	0,31	0,44	0,19	0,06

Fonte: Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional em Biofármacos

Esse resultado é reforçado pela predição do P2Rank, na qual a região correspondente a P_0 obteve, notadamente, a melhor pontuação (Tabela 13). Essa cavidade foi identificada pelo *docking* cego e é a mesma na qual interage o flavonoide morina, que possui estrutura similar ao eriodictiol (Figura 42).

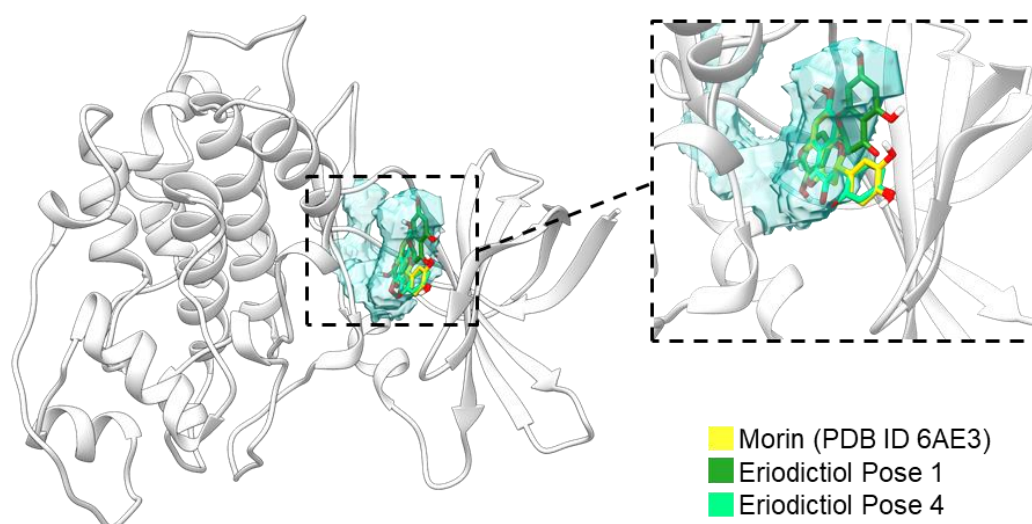
Tabela 13 - Resultados obtidos da análise do ranqueamento das quatro cavidades detectadas pelo P2Rank pertencentes ao GSK3 β

Ranking	Escore da cavidade	Escore de probabilidade
1	11,53	0,438
2	2,10	0,022
3	1,70	0,012
4	1,51	0,009

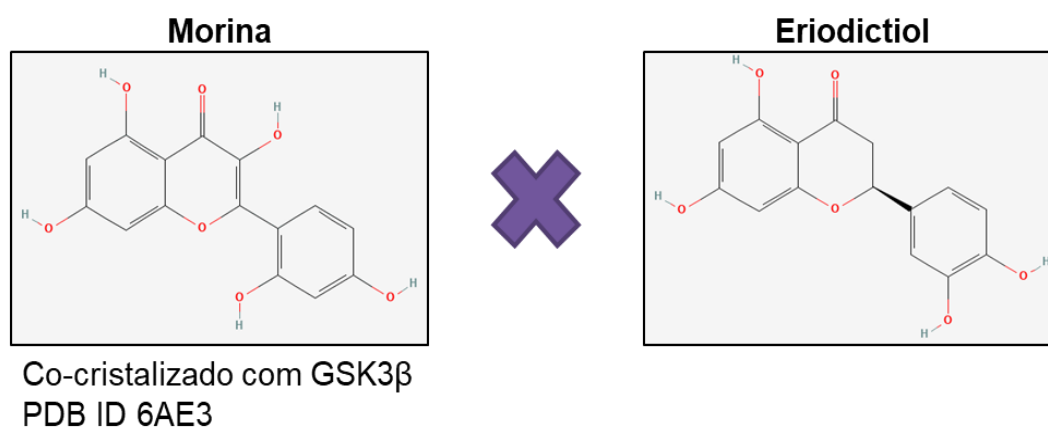
Fonte: Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional em Biofármacos

Figura 42 - Resultados obtidos pelos servidores DogSiteScorer para análise de cavidades de GSK3 β para ligação do eriodictiol

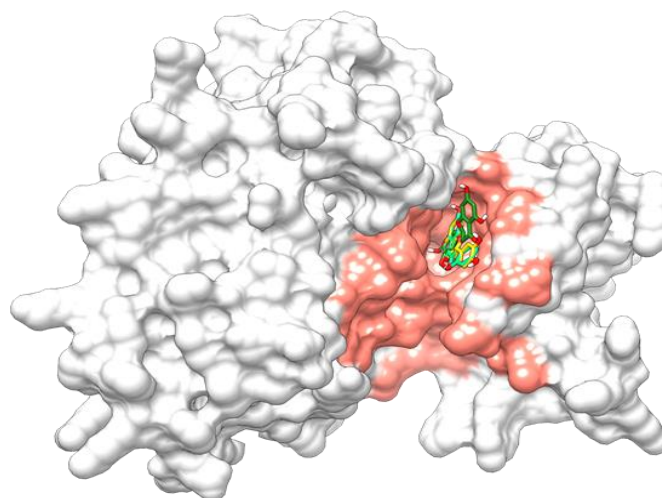
A



B



C



Fonte: Chimera. A) Sobreposição das poses de docking da região 1 e do ligante cristalográfico morina com a cavidade P_0. B) Semelhança estrutural entre a morina e o eriodictiol. C) Superfície de GSK3 β , com a região mais bem ranqueada pelo P2Rank colorida em rosa.

5.3.3.3 Docking Dirigido do eriodictiol ao GSK3 β

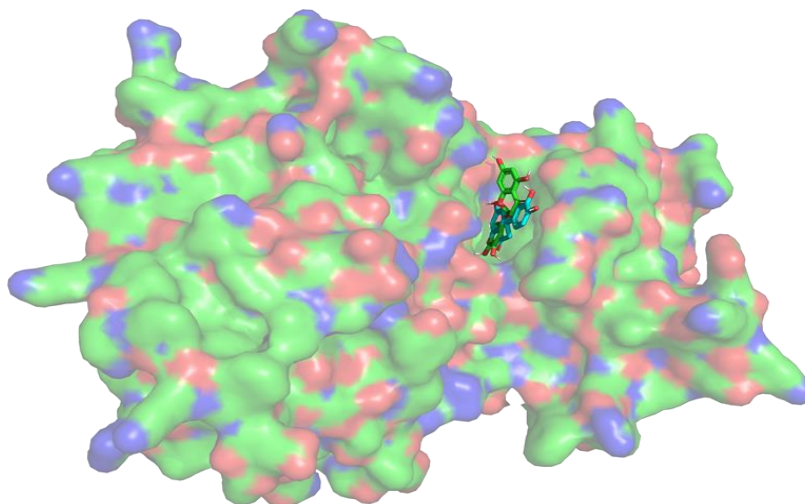
O *docking* dirigido na região 1 objetivou uma descrição mais acurada da pose do ligante eriodictiol no sítio identificado em GSK3 β (Figura 43). Dez poses foram geradas, das quais duas foram selecionadas para realização de simulações de dinâmica molecular (Tabela 14).

Tabela 14 - Interação entre GSK3 β e eriodictiol a afinidade predita (kcal/mol) de cada pose

REGIÃO I	Pose	Energia (kcal/mol)
	1	-8.3
	2	-8.0
	3	-8.0
	4	-8.0
	5	-7.7
	6	-7.7
	7	-7.6
	8	-7.6
	9	-7.6
10	-7.6	

Fonte: Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional em Biofármacos. As linhas coloridas em verde e azul representam, respectivamente, cada pose do eriodictiol na figura 43.

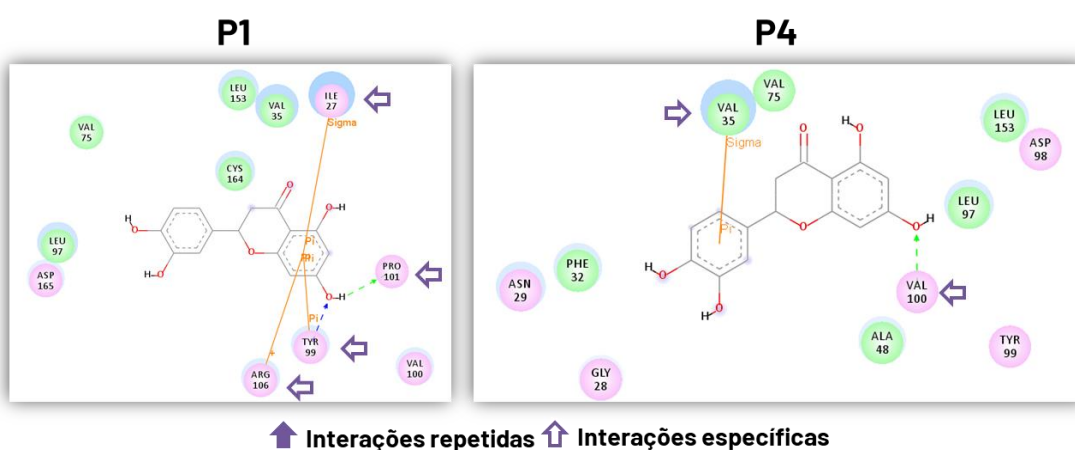
Figura 43 - Interação entre GSK3 β e eriodictiol com a visualização tridimensional da interação pelo programa PyMOL. A representação de superfície da proteína está colorida de acordo com os átomos (carbonos em verde, oxigênios em vermelho e nitrogênios em azul)



Fonte: PyMOL.

Apesar de localizadas na mesma região, o eriodictiol interage diferentemente com o sítio em cada pose: a pose 1 faz interações com os resíduos Ile27, Tyr99, Pro101 e Arg106, e a pose 4 com a Val35 e Val100 (Figura 44).

Figura 44 - Diagrama 2D de interações do eriodictiol com GSK3 β na (A) Região I, (B) Região 2 e (C) Região 3. Setas pontilhadas representam ligações de hidrogênio



Fonte: Discovery Studio. As setas tracejadas em verde a azul representam ligações de hidrogênio.

5.3.3.4 Dinâmica molecular dos complexos eriodictiol/GSK3 β

A estabilidade do ligante na região 1 foi avaliada pelo RMSD em relação a pose de *docking*, onde valores médios abaixo de 5 Å indicam estabilidade. Ambas as poses se mantiveram abaixo deste valor de corte nas três replicatas, indicando um reconhecimento apropriado da molécula no sítio proposto (Tabela 15 e Figura 45).

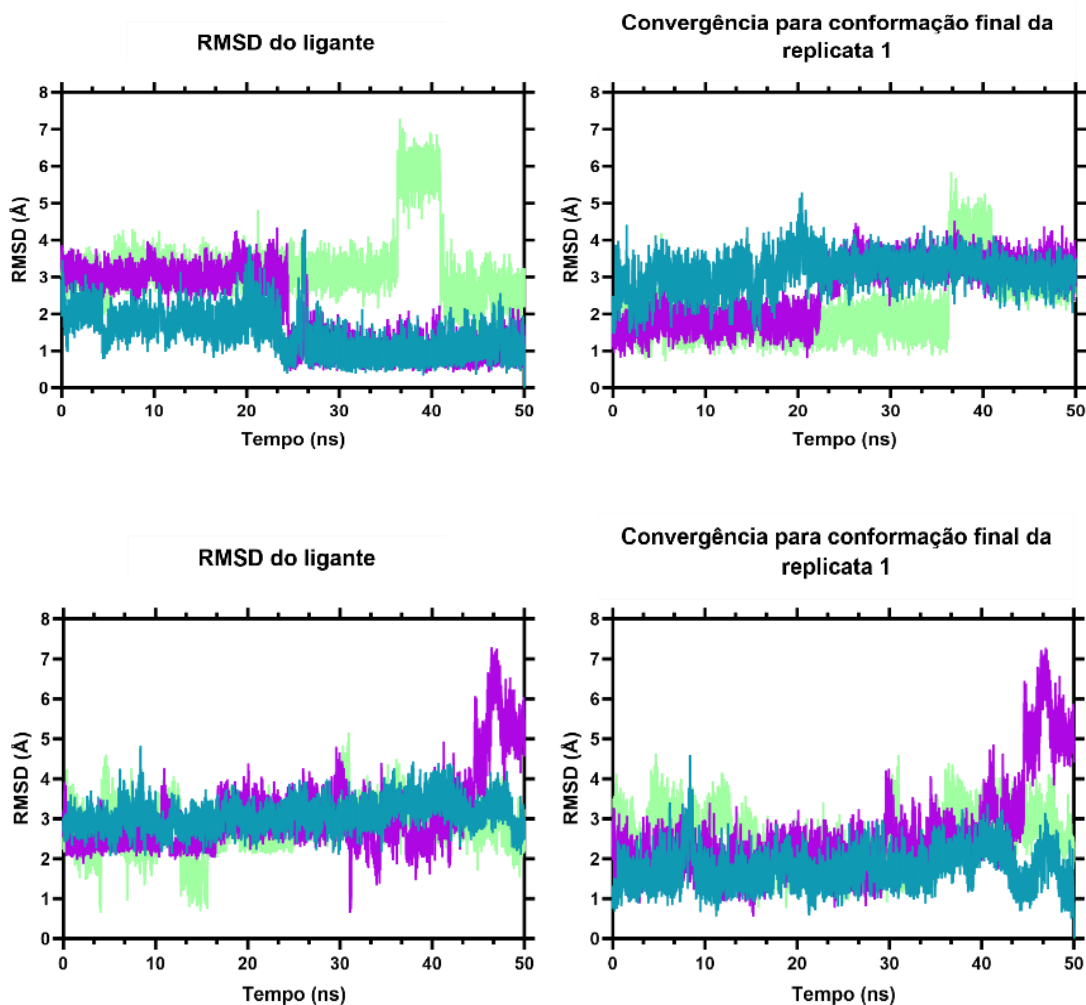
Tabela 15 - Dinâmica molecular de dez complexos eriodictiol/GSK3 β . As tabelas incluem o RMSD médio e os valores mínimo e máximo para cada replicata de cada pose simulada

Região 1 Pose 1	R1	R2	R3
Média RMSD ligante (Å)	3,13	2,64	2,15
RMSD primeiro frame ligante (Å)	1,91	1,65	1,87
RMSD último frame ligante (Å)	3,50	3,05	2,69
Mínimo RMSD Ligante (Å)	1,38	0,80	0,71
Máximo RMSD Ligante (Å)	5,26	4,49	5,81

Região 1 Pose 4	R1	R2	R3
Média RMSD ligante (Å)	3,09	3,08	2,79
RMSD primeiro frame ligante (Å)	2,84	2,85	2,66
RMSD último frame ligante (Å)	2,75	4,77	2,33
Mínimo RMSD Ligante (Å)	2,09	0,63	0,64
Máximo RMSD Ligante (Å)	4,82	7,29	5,15

Fonte: Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional em Biofármacos

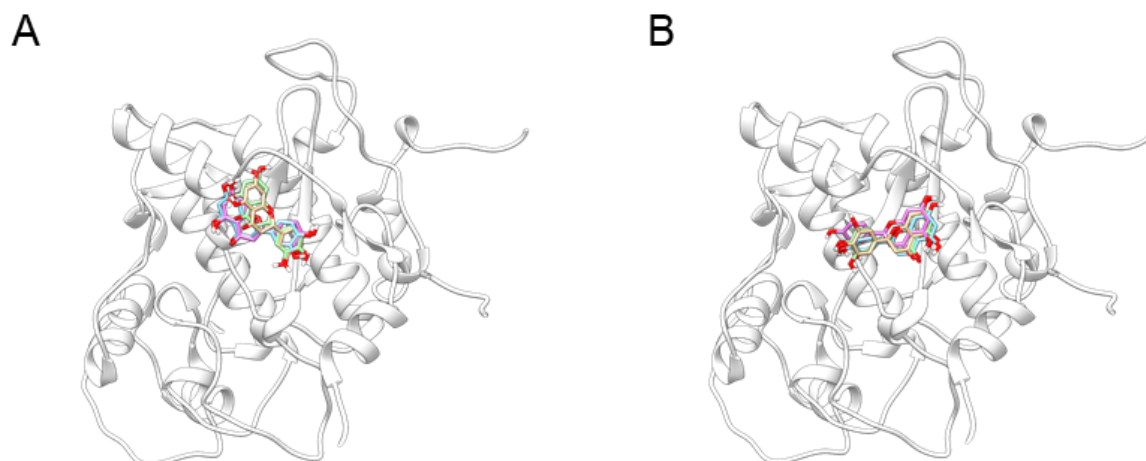
Figura 45 - RMSD do eriodictiol ao longo da simulação e a convergência para conformação final na replicata 1. A) Pose 1. B) Pose 4



Fonte: GraphPad Prism.

A avaliação do ligante na pose 1 ao longo do tempo simulado aponta um aumento do RMSD aos 36 ns da replicata 3. No entanto, o RMSD em relação a última conformação da replicata 1, que foi utilizado para identificar uma possível convergência, evidencia que tal aumento pode representar apenas um reajuste da molécula no sítio para um modo de ligação semelhante ao da pose 1. Já o RMSD da pose 4 manteve-se estável, com um breve aumento ao final da replicata 2 (Figura 45). Não obstante, faz-se necessário a extensão do tempo de simulação para identificar o que tal aumento representa para interação proteína-ligante (Figura 46).

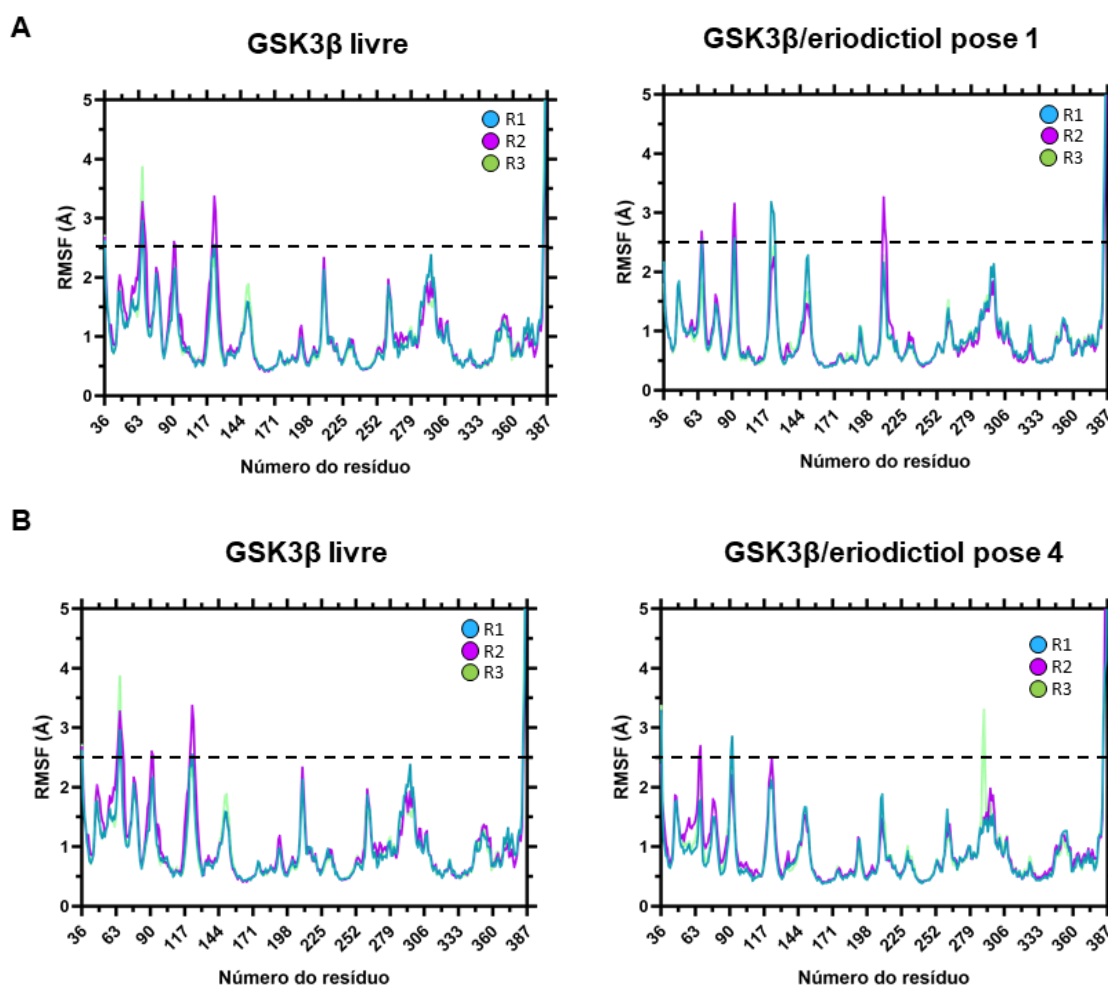
Figura 46 - Dinâmica molecular de complexos eriodictiol/GSK3 β nas conformações finais de cada replicata. A) Pose 1. B) Pose 4



Fonte: Chimera. A estrutura secundária de GSK3 β (branco) com as poses de docking (colorido).

Uma vez demonstrada a estabilidade da interação do eriodictiol com GSK3 β , análises de RMSF e PCA foram conduzidas a fim de identificar os efeitos da molécula sobre o comportamento dinâmico da proteína. As duas poses apresentaram a uma leve redução do RMSF nas regiões próximas aos resíduos 64 e 260, indicando uma rigidificação dessas regiões de alça ou *loop* causada pela presença do eriodictiol (Figura 47). A região próxima ao resíduo 225 teve um aumento de flexibilidade no complexo com o eriodictiol na pose 1 (Figura 47 A), mas o efeito oposto foi observado no complexo com a pose 4 (Figura 47 B).

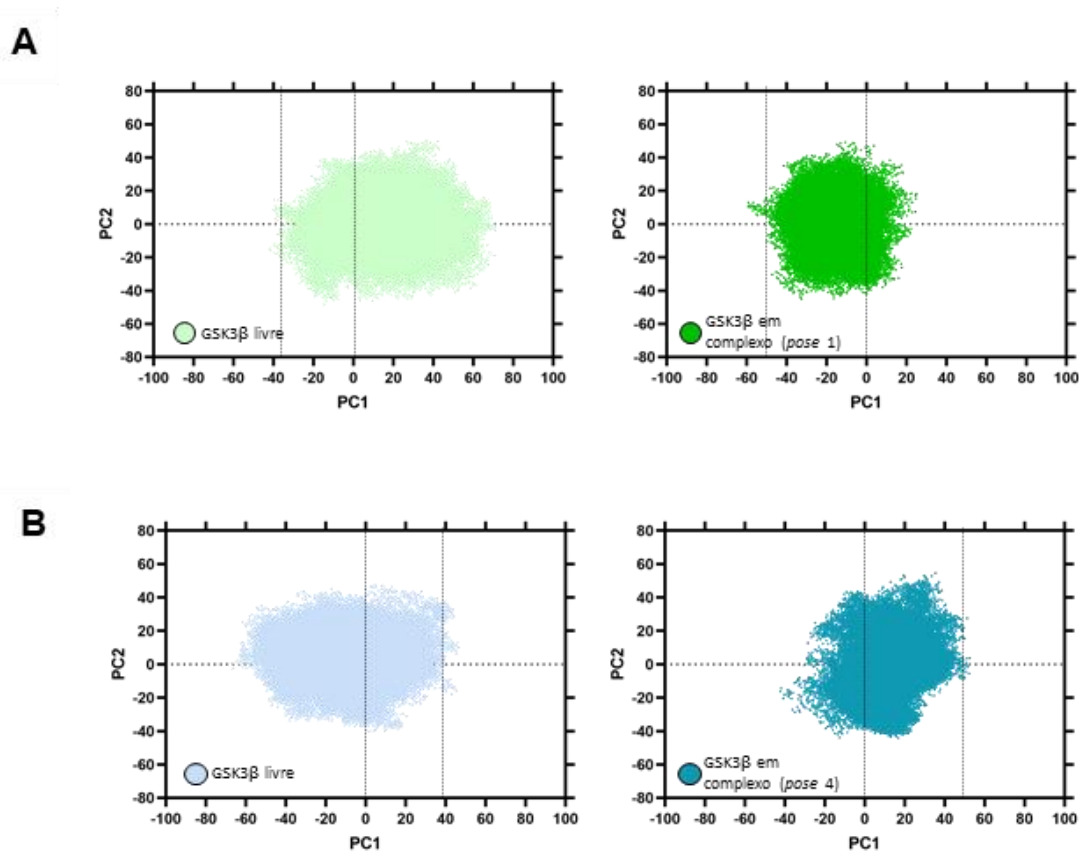
Figura 47 - Efeitos da interação com eriodictiol em GSK3 β . A) RMSF de GSK3 β livre e nos complexos com eriodictiol nas poses 1. B) RMSF de GSK3 β livre e nos complexos com eriodictiol nas poses 4



Fonte: GraphPad Prism.

Complementarmente, foi realizada uma análise de PCA para projetar a amostragem conformacional da cadeia principal de GSK3 β no subespaço definido pelos dois primeiros Componentes Principais (PC1 e PC2, do inglês “*Principal Component*”). Ao comparar os resultados das simulações da proteína livre com os complexos com o eriodictiol, é possível sugerir que a presença do ligante levou a uma restrição (redução) conformacional em GSK3 β , particularmente no subespaço da PC1 (Figura 48).

Figura 48 - PCA da cadeia principal de GSK3 β na proteína livre e em nos complexos com eriodictiol. A) Pose 1. B) Pose 2



Fonte: GraphPad Prism.

A avaliação das ligações de hidrogênio identificou uma interação polar presente em todas as replicatas das duas poses com Asp133, apontando este resíduo como possível âncora principal da molécula, ajudando a manter a estabilidade do complexo. Esta interação também está presente no cristal de GSK3 β com a morina (PDB ID: 6AE3). Desse modo, podemos inferir que o eriodictiol consegue interagir com GSK3 β de forma estável. Tal interação parece desencadear alterações na flexibilidade e no perfil de conformações adotados pela proteína ao longo da simulação que podem levar a inibição de sua atividade de quinase.

Tendo em vista a existência de informações experimentais da inibição de GSK3 β pela interação do flavonoide morina no mesmo sítio de interação (KIM *et al.*, 2018), é possível que uma molécula de esqueleto flavonoide similar e mesma classe química (flavonol), tal como o eriodictiol, exerça sua atividade biológica por mecanismo similar.

5.3.4 Efeitos do eriodictiol sobre Keap1

5.3.4.1 Docking cego do eriodictiol ao Keap1

O *docking* cego foi realizado para buscar as possíveis regiões mais favoráveis para interação do eriodictiol na superfície da proteína Keap1 (Tabela 16).

Tabela 16 - Interação entre Keap1 e eriodictiol por energia (kcal/mol) de cada pose

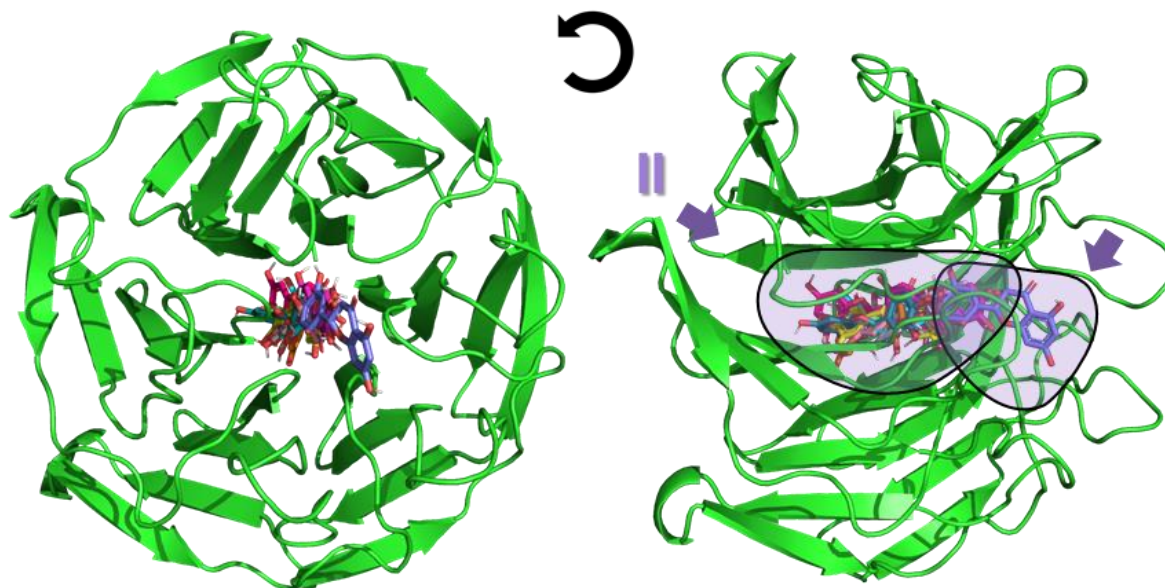
Pose	Energia (kcal/mol)
1	-9.1
2	-8.9
3	-8.8
4	-8.7
5	-8.6
6	-8.6
7	-8.5
8	-8.4
9	-8.4
10	-8.2

Fonte: Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional em Biofármacos.

Foi observado que o eriodictiol interage em duas regiões do Keap1 (Figura 49). Vale ressaltar que a região 1 é a mesma na qual o ligante ácido 3-(4-clorofenil) propanóico, co-cristalizado com Keap1 (PDB ID: 5FNQ), interage experimentalmente (DAVIES *et al.*, 2016).

Entretanto, visto a presença da informação experimental (DAVIES *et al.*, 2016) sobre o sítio de interação do ligante ácido 3-(4-clorofenil) propanóico no cristal de Keap1, a cavidade na qual o ácido 3-(4-clorofenil) propanóico interage foi priorizada para os testes com o eriodictiol.

Figura 49 - Localização das regiões de interação entre Keap1 e eriodictiol



Fonte: PyMol

5.3.4.2 Busca por cavidades drogáveis em Keap1

A região da cavidade P_0 obteve a melhor pontuação de drogabilidade, dentre outros parâmetros avaliados pelo DoGSiteScorer (Tabela 17) e também foi ranqueada em primeiro lugar pelo P2Rank (Tabela 18). Esse sítio engloba as regiões 1 e 2 identificadas na etapa de *docking* (Figura 50).

Tabela 17 - Resultados obtidos pelos preditores de cavidade DogSiteScorer para análise de cavidades de Keap1. Na tabela estão os valores da análise dos descritores relacionados a tamanho, profundidade, drogabilidade e composição de aminoácidos pertencentes ao Kea

Cavidade	Superfície (Å²)	Volume (Å³)	Profundidade (Å)	Abertura	Escore simples	DrugScore	Composição de aminoácidos			
							Fração apolar	Fração polar	Fração positiva	Fração negativa
P_0	1121,6	1329,5	20,6	0,13	0,67	0,81	0,48	0,45	0,07	0,00
P_1	704,9	402,4	12,7	0,15	0,28	0,59	0,26	0,42	0,21	0,11
P_2	476,7	198,9	10,2	0,09	0,04	0,38	0,43	0,43	0,14	0,00
P_3	426,4	194,8	14,7	0,17	0,00	0,55	0,38	0,50	0,00	0,12
P_4	338,8	165,5	13,2	0,07	0,02	0,46	0,38	0,38	0,12	0,12

Fonte: Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional em Biofármacos

Esse resultado é reforçado pela predição do P2Rank, na qual a região correspondente a P_0 obteve, notadamente, a melhor pontuação (Tabela 18).

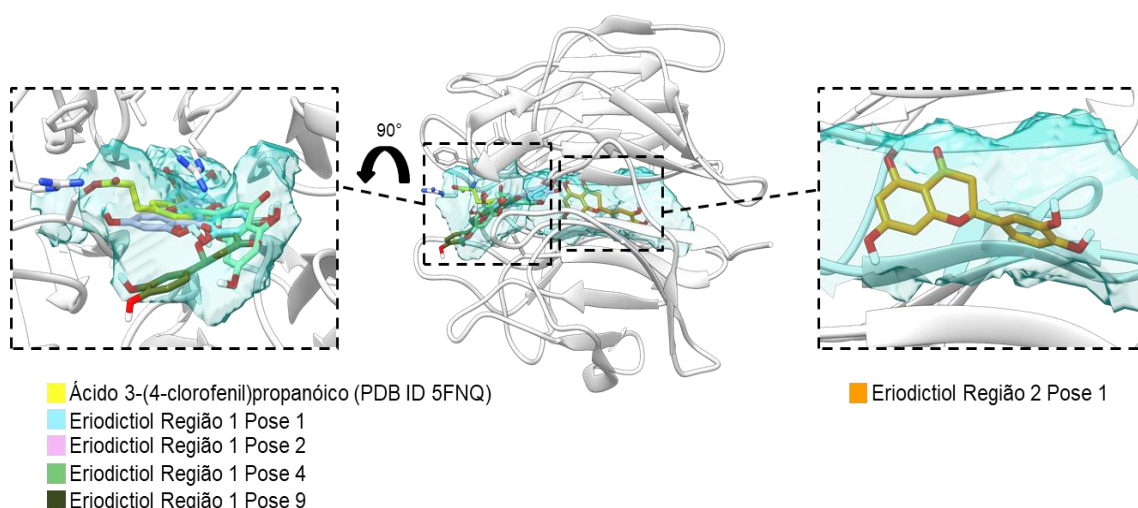
Tabela 18 - Resultados obtidos pelos preditores de cavidade P2Rank para análise de cavidades de Keap1. Na tabela estão os valores da análise do ranqueamento das quatro cavidades detectadas pelo P2Rank pertencentes ao Keap1

Ranking	Pocket Score	Escore de probabilidade
1	17,34	0,655
2	9,09	0,321
3	3,12	0,051
4	3,07	0,050
5	1,68	0,012

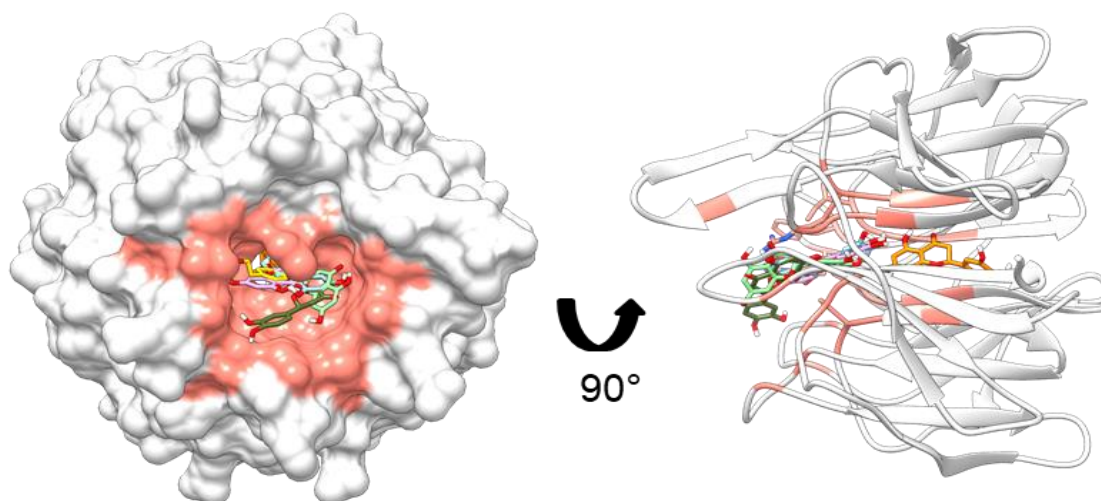
Fonte: Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional em Biofármacos

Figura 50 - Resultados obtidos pelo DogSiteScorer para análise de cavidades de Keap1 para ligação do eriodictiol. A) Sobreposição das poses de docking da região 2 e do ligante cristalográfico ácido 3-(4-clorofenil) propanoico. B) Superfície e estrutura secundária de Keap1 (branco), com a região mais bem ranqueada (rosa) pelo P2Rank

A



B



Fonte: Chimera.

5.3.4.3 Docking Dirigido do eriodictiol ao Keap1

A partir das dez poses geradas pela predição do AutoDock Vina (Tabela 19), foram selecionadas quatro na região 1, equivalente a entrada da cavidade em formato de túnel, onde foi co-cristalizado o ligante ácido 3-(4-clorofenil) propanóico, e uma na região 2, localizada no centro do túnel (Figura 51).

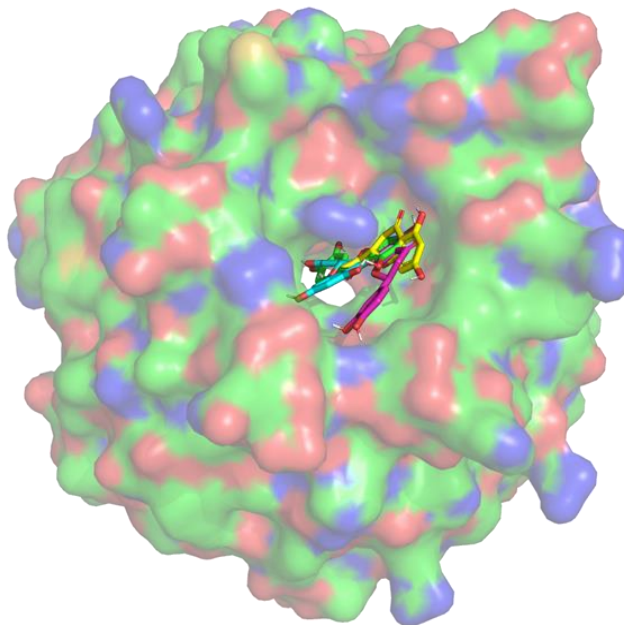
Tabela 19 - Interação entre Keap1 e eriodictiol com a afinidade predita (kcal/mol) de cada pose

REGIÃO I	Pose	Energia (kcal/mol)	REGIÃO II	Pose	Energia (kcal/mol)
	1	-8.3		1	-9.2
	2	-8.2		2	-8.8
	3	-8.1		3	-8.7
	4	-8.0		4	-8.6
	5	-7.9		5	-8.6
	6	-7.9		6	-8.4
	7	-7.7		7	-8.4
	8	-7.7		8	-8.4
	9	-7.1		9	-8.3
10	-7.1	10	-8.2		

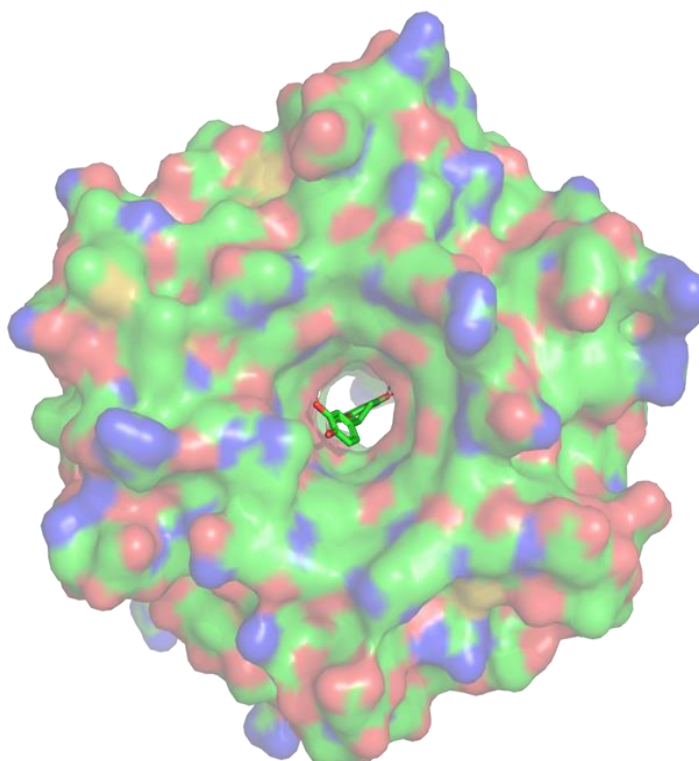
Fonte: Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional em Biofármacos. As linhas coloridas em verde, azul, amarelo e roxo representam, respectivamente, cada pose do eriodictiol na figura 51.

Figura 51 - Interação entre Keap1 e eriodictiol com a visualização tridimensional da interação pelo programa PyMOL e a afinidade predita (kcal/mol) de cada pose. A) Região I. B) Região II

A



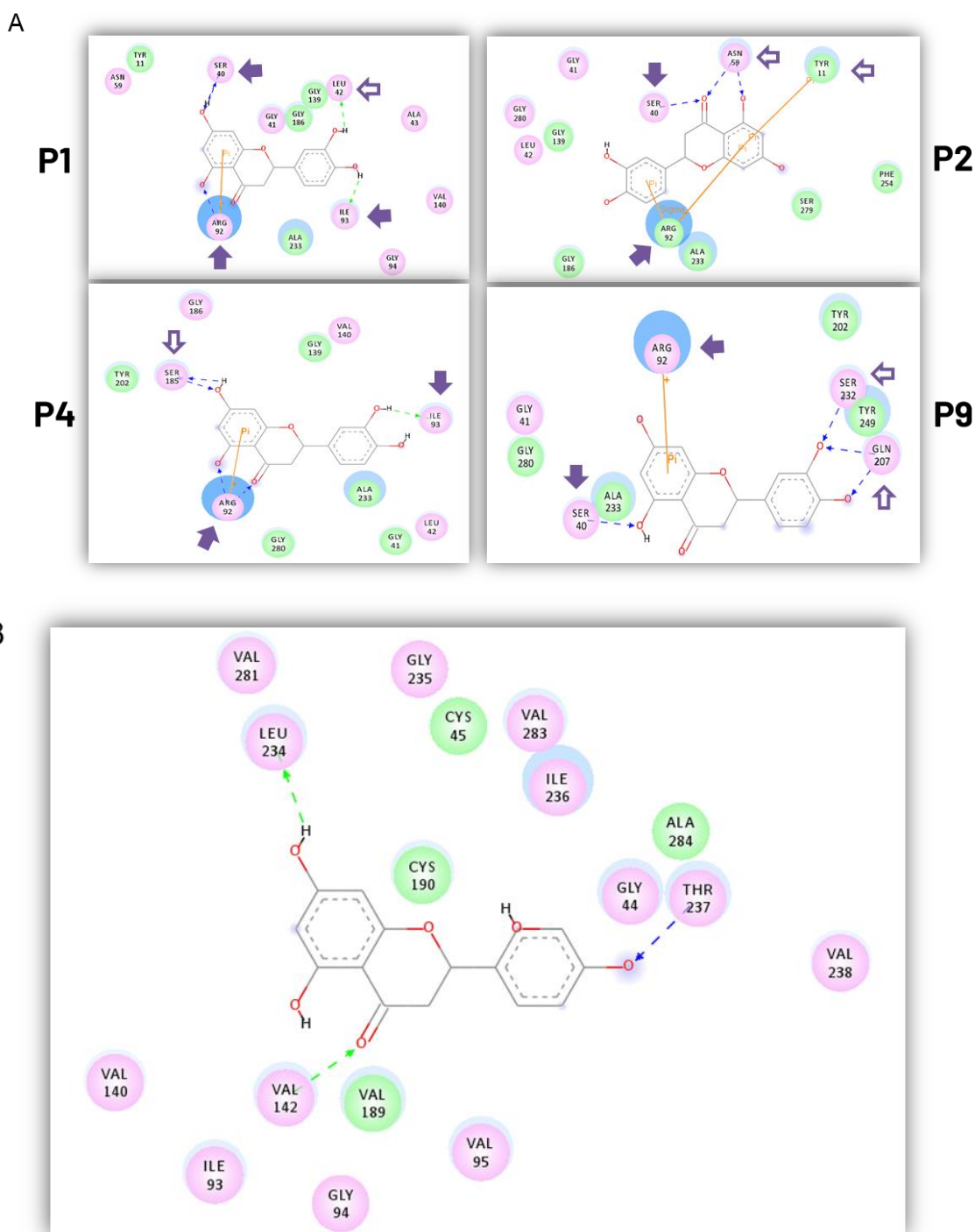
B



Fonte: PyMol. A representação de superfície da proteína está colorida de acordo com os átomos (carbonos em verde, oxigênios em vermelho e nitrogênios em azul).

Nas poses escolhidas para o eriodictiol na região 1, a molécula é ancorada por interações com a Arg92 e, ocasionalmente, com a Ser40 ou Ile93. Já na região 2, as principais interações são estabelecidas com a Val142, Leu234 e Thr237 (Figura 52).

Figura 52 - Diagrama 2D de interações do eriodictiol com Keap1 na (A) Região I e (B) Região 2



Fonte: Discovery Studios. Setas pontilhadas em azul e verde representam ligações de hidrogênio.

5.3.4.4 Dinâmica molecular dos complexos eriodictiol/Keap1

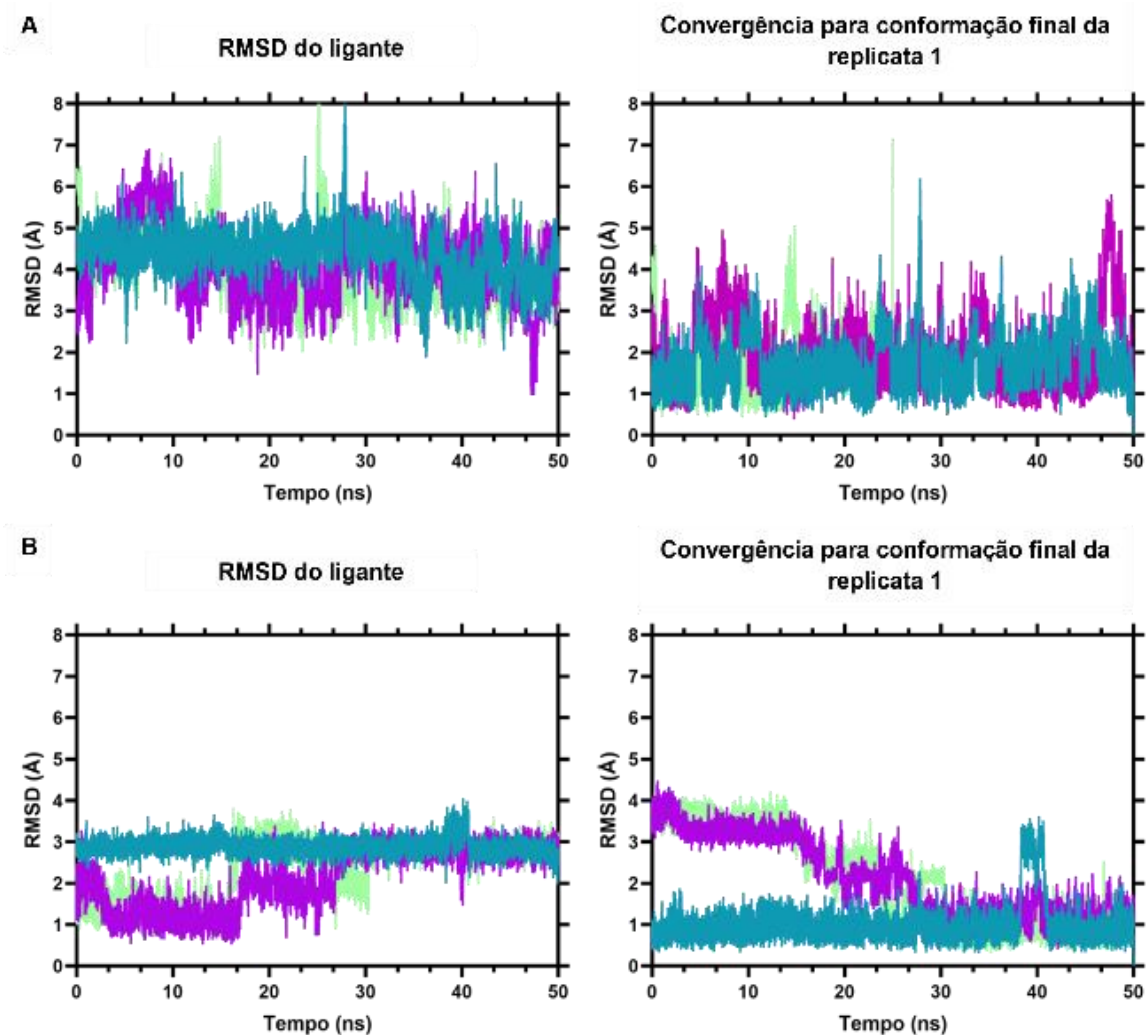
A estabilidade do ligante nas duas regiões propostas em Keap1 pelo *docking* foram avaliadas por dinâmica molecular. Das cinco poses testadas, apenas duas se mantiveram com valores de RMSD médio abaixo de 5 Å (Tabela 20), indicando estabilidade: a pose 9 na região 1, e a pose 1 na região 2 (Figuras 53 e 54).

Tabela 20 - Dinâmica molecular de complexos eriodictiol/Keap1. As tabelas incluem o RMSD médio e os valores mínimo e máximo para cada replicata de cada pose simulada

REGIÃO I - POSE 9	R1	R2	R3	REGIÃO II - POSE 1	R1	R2	R3
Média RMSD ligante (Å)	4,36	4,14	4,02	Média RMSD ligante (Å)	2,89	2,11	2,34
RMSD primeiro frame ligante (Å)	4,81	2,91	6,21	RMSD primeiro frame ligante (Å)	2,83	1,25	1,51
RMSD último frame ligante (Å)	4,35	3,69	3,45	RMSD último frame ligante (Å)	2,84	2,59	2,93
Mínimo RMSD Ligante (Å)	1,86	0,95	1,98	Mínimo RMSD Ligante (Å)	1,99	0,53	0,63
Máximo RMSD Ligante (Å)	8,05	6,92	8,89	Máximo RMSD Ligante (Å)	4,05	3,49	3,82

Fonte: Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional em Biofármacos

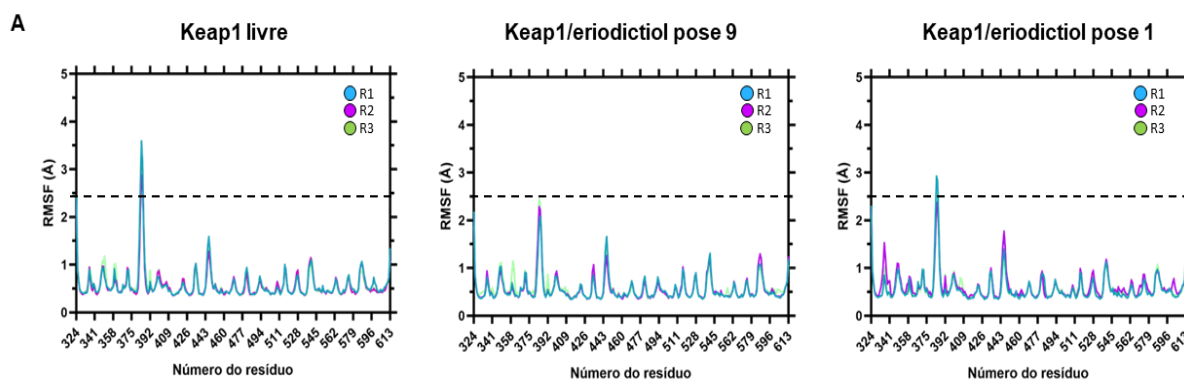
Figura 53 - RMSD do ligante ao longo do tempo de simulação. A) Região 1 Pose 9. B) Região 2 Pose 1



Fonte: GraphPad Prism

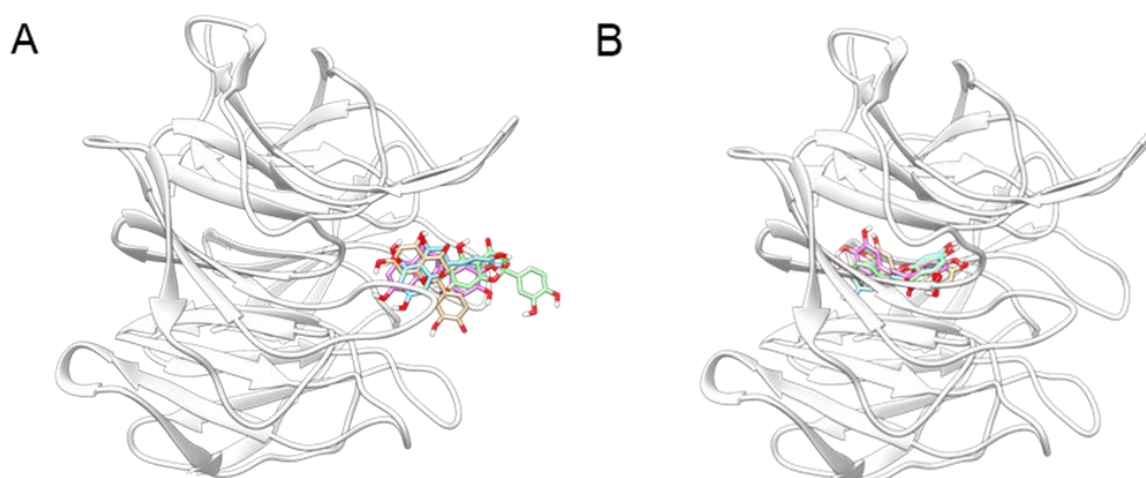
A análise temporal do RMSF em relação a pose de *docking* e em relação ao último quadro de simulação demonstraram estabilidade e convergência do ligante para uma conformação final semelhante à da replicata 1 tanto para pose 9 da região 1, quanto para pose 1 da região 2 (Figuras 54 e 55). A diminuição de RMSF mais significativa observada para as duas poses foi nas regiões entre os resíduos 375 e 392 próximos ao ligante (eriodictiol), indicando uma rigidificação desse segmento na presença do ligante (Figura 55).

Figura 54 - Efeitos na interação na dinâmica molecular de complexos eriodictiol/Keap1. Os gráficos demonstram o RMSF do ligante ao longo da simulação e a convergência para conformação final do eriodictiol para as poses com valores de RMSF médio abaixo de 5 Å, indicando estabilidade: a pose 9 na região 1, e a pose 1 na região 2



Fonte: GraphPad Prism.

Figura 55 - Dinâmica molecular de complexos eriodictiol/Keap1. A) Região I, pose 9 e B) Região II, pose 1



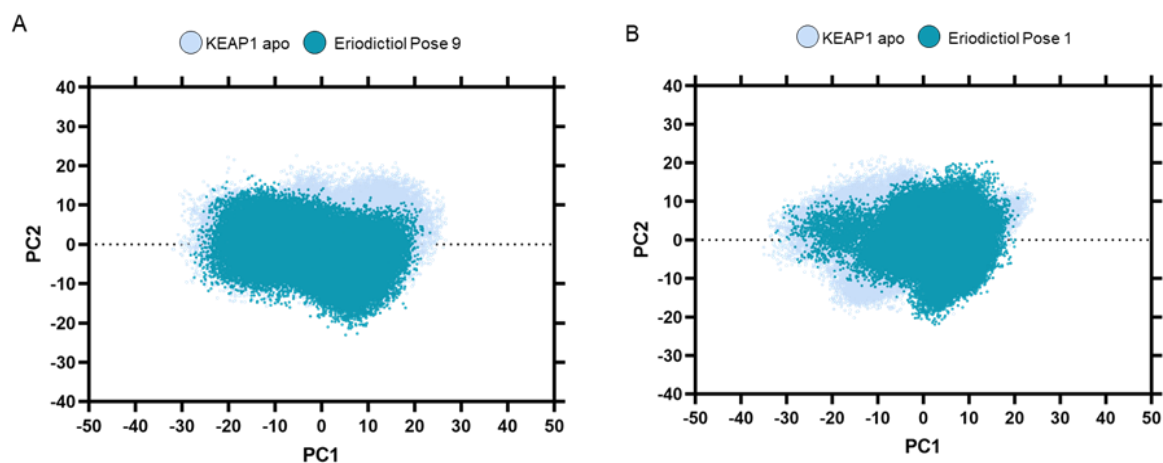
Fonte: Chimera. A estrutura secundária de Keap1 (branco) com as poses de docking (colorido).

A pose 9 estabeleceu ligações de hidrogênio com a Ser364 e Ser602 em todas as replicatas. Já a pose 1 foi ancorada ao sítio por ligações de hidrogênio com a Val418 e Val604, também presente em todas as replicatas.

Na PCA, a presença do ligante na região 1 parece não afetar significativamente o espaço conformacional amostrado por Keap1 (Figura 56). Na região 2, no entanto, é possível observar tanto um possível efeito de restrição como de expansão conformacional em PC1. Portanto, é possível sugerir que o eriodictiol pode interagir de forma estável com Keap1 na

entrada do túnel (região 1), mas o mesmo apenas parece causar alterações conformacionais ao interagir na região mais interna da cavidade (região 2). Vale ressaltar que não é possível verificar se a entrada na molécula na parte mais interna do túnel, representada pela região 2, é favorável por métodos convencionais de simulação.

Figura 56 - Efeitos da interação com eriodictiol em Keap1. PCA da cadeia principal de Keap1 na proteína livre (apo) e em nos complexos com eriodictiol



Fonte: GraphPad Prism.

6 DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Neste estudo, mostramos que nenhuma alteração significativa foi verificada na atividade exploratória, na atividade locomotora e na glicemia dos animais com a infusão da STZ e com o tratamento com o eriodictiol. O modelo de DAE causou déficits na memória e no aprendizado dos animais, evidenciado no prejuízo do desempenho cognitivo desses roedores na memória operacional, aversiva, de reconhecimento de objetos e espacial. O tratamento com o eriodictiol protegeu significativamente na memória aversiva (recente), no índice de reconhecimento objetos (recente e tardia) e na memória espacial (tempo de latência). Os estudos bioquímicos demonstraram que a STZ causa estresse oxidativo e neuroinflamação, significativamente, pelo aumento nas concentrações de nitrito e na imunorreatividade de GFAP no hipocampo, também pela redução de GSH no hipocampo e pelo aumento de MDA e diminuição de sinaptofisina no córtex pré-frontal. O tratamento com eriodictiol foi capaz de diminuir significativamente o aumento da concentração de nitrito e de prevenir a redução das concentrações de GSH no hipocampo. As análises *in silico* sugerem que o eriodictiol possui efeito inibidor da GSK3B e ativador da via Nrf2/Keap1.

Sabendo que a Diabetes Mellitus (DM) é um fator de risco para a Doença de Alzheimer Esporádica (DAE) e vice-versa, especificamente, envolvendo o comprometimento da sinalização insulínica cerebral não necessariamente associadas ao metabolismo da glicose (LEE *et al.*, 2011), estratégias terapêuticas para superar a deficiência e a resistência à insulina no SNC podem ser uma opção no tratamento de deficiências cognitivas como a DA (FERREIRA *et al.*, 2018).

Evidências sugerem que compostos fitoquímicos, principalmente polifenóis como os flavonóides, derivados de vegetais e frutos, promovem efeitos benéficos sobre reversão dos déficits na função cognitiva relacionados a idade, além de prevenir o aparecimento de doenças neurodegenerativas (UDDIN *et al.*, 2020; JOSEPH *et al.*, 2009; SHUKITT-HALE *et al.*, 2006). Estes possuem baixo peso molecular e são capazes de modular a memória exercendo atividade farmacológica em receptores, quinases e fatores de transcrição em diferentes tipos celulares (CHUN, 2008; SPENCER, 2009; RENDEIRO, 2011; HASSAN *et al.*, 2022).

As flavanonas, também conhecidas como dihidroflavonas, são uma importante classe de flavonóides amplamente encontradas em frutas cítricas, tais como em toranjas (naringina, naringenina e naringenina 7-O-neohesperidoside), em laranjas, tangerinas, limas e limões (hesperidina, hesperetina e hesperetina 7-O-rutinoside). O eriodictiol é a flavona mais

presente nos limões, assim como os derivados eriocitrina (eriodictyol 7-O- β -D-rutinoside) e o eriodictyol 7-O-rutinoside (TERAHARA, 2015; AGRAWAL, 2011).

Uma revisão de literatura atual sobre as flavonas do limão destacou que seus efeitos terapêuticos antioxidantes, anti-inflamatório e antidiabético são mais potentes na supressão de doenças com excessivo estresse oxidativo, como nas doenças neurodegenerativas e na Diabetes Mellitus (DM) (YAO *et al.*, 2022). Previamente, estudos dedicados à investigação do efeito neuroprotetor do eriodictiol em modelos animais já foram realizados, tendo em vista que o eriodictiol é o antioxidante mais consumido no mundo (DENG *et al.*, 2020), pois está presente na dieta diária de muitas pessoas, assim é possível compreender a relevância de tais estudos.

Como a Doença de Alzheimer Esporádica (DAE) é associada a dificuldades na aprendizagem e na memória (AGRAWAL, 2011), foi escolhido o modelo experimental de DAE por injeção intracerebroventricular (i.c.v) de estreptozotocina (STZ) em camundongos SWISS com o objetivo de avaliar o possível efeito do eriodictiol nos déficits de memória de trabalho, episódica, declarativa e espacial. Isso porque já é sabido que o modelo gera uma redução crônica no metabolismo da glicose no córtex cerebral e no hipocampo (PLASCHKE; HOYER, 1993) com efeitos associados a um progressivo déficit no aprendizado, na memória e no balanço energético cerebral (DUELLI *et al.*, 1994).

Inicialmente, ao 12º dia após o protocolo cirúrgico, os animais foram avaliados na atividade locomotora e foi demonstrado que não houve nenhuma alteração no comportamento exploratório e atividade locomotora com a infusão da STZ e com o tratamento com o eriodictiol nas duas doses testadas (2 e 4 mg/kg v.o.).

Estes dados corroboram com estudos que demonstram não haver alteração na atividade locomotora e no comportamento exploratório dos animais que receberam injeção de STZ, demonstrando que não há déficit motor nesse modelo (PACHECO *et al.*, 2018; BIASIBETTI *et al.*, 2017). O tratamento com o eriodictiol também não alterou a atividade locomotora dos animais, corroborando com outros autores em modelos de demência (BELZUNG; GRIEBEL, 2001; HOYER, 2004; BEZERRA, 2019; ZHANG; LIU; YUAN, 2020).

Sabendo que o dano neuronal causado pela administração da STZ pode atingir diferentes regiões do SNC, como o septo, regiões do corpo caloso (KRASKA *et al.*, 2012), córtex perirrinal, hipocampo e estruturas periventriculares (SHOHAM *et al.*, 2003), o Teste do Labirinto em Y (SARTER *et al.*, 1988) foi realizado como medida de memória de trabalho ou operacional, definida como uma memória ultra-rápida que representa o armazenamento temporário de informação utilizado para planejar uma ação futura (KIM *et al.*, 2006). As

principais áreas cerebrais envolvidas nesse tipo de memória são o hipocampo e o córtex pré-frontal (CPF) (YOO *et al.*, 2008). Além dessas, outras regiões como estriado, diencéfalo e cerebelo influenciam o desempenho dos animais nesse teste (LALONDE, 2002).

Os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram déficits significativos na porcentagem de alternâncias espontâneas, indicando um prejuízo na memória de trabalho consistente com estudos anteriores desse modelo (QUEIROZ, 2016; GHASEMIKASMAN *et al.*, 2018; BEZERRA, 2019). Segundo alguns autores, essa piora da memória de trabalho pode ser explicada pelos efeitos tóxicos da STZ nos receptores de insulina (IR), reduzindo o metabolismo da glicose no cérebro e, conseqüente, diminuição de ATP e na produção de Acetil-CoA, reduzindo a transmissão colinérgica (HOYER, 2004; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013).

Encontra-se na literatura evidências experimentais de que o eriodictiol é capaz de melhorar o desempenho no labirinto em Y nas mesmas doses testadas, mas na via de administração intraperitoneal (i.p) em camundongos isquemiados (FERREIRA, 2016) e em camundongos transgênicos APP/ PS1 tratados com uma dose maior (50 mg/kg, i.p) (LI *et al.*, 2022). O eriodictiol (2 e 4 mg/kg v.o.) não protegeu os animais dos déficits de memória operacional, esse resultado sugere que o efeito do eriodictiol pode variar com a dose testada, a via de administração (que influencia na biodisponibilidade) e com o modelo animal estudado.

No presente estudo também foi avaliada a memória episódica por um teste robusto muito utilizado para avaliar, principalmente, o hipocampo e o córtex perirrinal (WIN-SHWE; FUJIMAKI; 2011). Essa última área cerebral é importante para a entrada de informações sensoriais (estímulos visuais, olfativos e somatossensoriais) e geração de impulsos nervosos ao hipocampo (ANTUNES; BIALA, 2012). Desse modo, a tarefa do reconhecimento de objeto está intimamente relacionada com o bom funcionamento do córtex perirrinal na memória de curto prazo ou memória recente (WINTERS *et al.*, 2008), enquanto o hipocampo e o córtex pré-frontal são responsáveis pela consolidação e recuperação da memória de longa duração (WANG *et al.*, 2011).

Na avaliação do índice de reconhecimento, os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram déficits na memória recente e na memória tardia, corroborando os resultados da literatura desse modelo (GRAWAL, 2009; WANG, 2011; QUEIROZ, 2016). A dificuldade na aquisição e retenção de memória provavelmente também está associada com o prejuízo na sinalização cerebral da insulina induzido pela STZ (CORREIA *et al.*, 2012). Assim, o modelo utilizado comprovou ser eficiente em fornecer déficits cognitivos importantes e característicos

da DAE (LANNERT; HOYER, 1998; STEEN *et al.*, 2005; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2006).

O tratamento com o eriodictiol promoveu uma melhora significativa dos déficits de memória recente (2 e 4 mg/kg, v.o.) e tardia (4 mg/kg, v.o) no índice de reconhecimento do objeto. Esse efeito preventivo também foi observado na dose de 100 mg/kg v.o em ratos no modelo de depressão induzido por lipopolissacarídeo (LPS, 1 mg/kg), uma endotoxina bacteriana (ZHANG; LIU; YUAN, 2020) e, provavelmente, se deve a ação antioxidante e antiinflamatória do eriodictiol resultando em uma melhora do aprendizado, memória, e redução no dano neuronal induzido pelo STZ.

Na avaliação da memória aversiva, associada à função da amígdala, do hipocampo, do septo medial, do bulbo olfatório e áreas talâmicas (IZQUIERDO *et al.*, 2006), os resultados mostraram que o STZ promoveu déficits na retenção da memória recente (MR) e na memória tardia (MT). Corroborando com os resultados de indução do mesmo modelo em outras pesquisas (BEZERRA, 2019; KIM *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2017). Uma possível base biológica para justificar este declínio na cognição seria que a deficiência do metabolismo energético nos neurônios colinérgicos (LESTER-COLL *et al.*, 2006; TOTA *et al.*, 2011) e a menor disponibilidade de ATP no cérebro, gerada por STZ, é responsável pela menor produção tanto da Acetil-CoA quanto da colina-acetiltransferase (ChAT), responsáveis pela produção da acetilcolina, levando a um prejuízo dos mecanismos relevantes para a formação da memória devido a uma redução na transmissão sináptica (SZUTOWICZ *et al.*, 2013).

Na literatura, o efeito antioxidante neuroprotetor na memória declarativa parece ser potencializado em tratamentos com substâncias que também possuem ações anticolinesterásicas (SONKUSARE *et al.*, 2005). Esse resultado não foi analisado no presente trabalho, contudo, o trabalho de Dzoyen e colaboradores observou que o 6-8-diprenyleriodictyol, um análogo do eriodictiol, possui atividade anticolinesterásica e inibitória de óxido nítrico (NO) em doses sub tóxicas *in vitro* (DZOYEM *et al.*, 2017).

Outros estudos envolvendo o efeito dos flavonoides em modelos de DAE, demonstraram que o tratamento com curcumina promoveu a diminuição do estresse oxidativo e a neuroproteção (PAN *et al.*, 2008; REETA; MEHLA; GUPTA, 2010). Amoah e colaboradores (2015) demonstraram que sesquiterpenos com efeitos antioxidantes diminuiram, significativamente, o comprometimento da memória no teste de esQUIVA passiva em modelo de DA induzido por peptídeo A β (A β 1-42), assim como no tratamento com óleo essencial extraído do *Borago officinalis* (GHAHREMANITAMADON *et al.*, 2014).

Além da esquiiva passiva, a memória declarativa pode ser acessada em roedores através do Teste do Labirinto Aquático (MORRIS *et al.*, 1982), amplamente utilizado para avaliar a memória espacial em vários modelos de estudos sobre a DAE experimental (KANG *et al.*, 2017; YING *et al.*, 2018). No presente trabalho, avaliamos a memória espacial (dependente da integridade do hipocampo) dos animais através dos critérios de latência (o tempo que o animal demora a encontrar a plataforma) e do número de cruzamentos.

Nessa avaliação, os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram déficits na memória espacial, demonstrando um maior tempo de latência para encontrar a plataforma e um menor número de cruzamentos no quadrante onde a plataforma estava escondida, corroborando com o trabalho de padronização do modelo de DAE por STZ no nosso grupo (QUEIROZ, 2016) e com outros estudos de DAE nesse modelo (GHASEMI-KASMAN *et al.*, 2018; KUMAR; SINGH, 2017; CHEN *et al.*, 2013; AGRAWAL, 2011).

O tratamento com o eriodictiol na dose de 4 mg/kg promoveu uma melhora no tempo de latência, mas não restaurou, significativamente, o número de cruzamentos. Esse resultado pode ser explicado pelo conhecido potencial antioxidante do eriodictiol e que foi demonstrado pelos resultados *in vitro* e *in silico*, corroborando com outros achados (HE *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2022). Outros flavonoides (rutina, silimarina e puerarina) também evidenciaram uma redução no estresse oxidativo em modelos de DAE, porém sem apresentarem uma diferença significativa no teste do labirinto aquático de Morris (Li *et al.*, 2020).

Na literatura, o flavonoide curcumina previne o déficit na memória espacial induzido por estresse crônico (XU *et al.*, 2009), por demência induzida por alumínio (KUMAR; DOGRA; PRAKASH, 2009) e por β -amilóide (AHMED; ENAM; GILANI, 2010). Esses resultados corroboram com estudos feitos com animais submetidos ao modelo de DAE induzido por peptídeo A β e tratados com substâncias naturais com ação antioxidante e antiinflamatória, no qual os animais tratados apresentaram uma diminuição significativa no tempo de latência para encontrar a plataforma (GHAHREMANITAMADON *et al.*, 2014; BUTTERFIELD; POCERNICH, 2003). Dessa forma, acredita-se que a sinalização de insulina pode ser regulada por Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) (LOPES; SILVA; FORTUNATO, 2008).

O modelo animal estudado pode variar quanto à sua suscetibilidade a diferentes patologias, com um espectro de resistência de cada linhagem à fisiologia, genética e alterações moleculares (FIOCRUZ, 2017). As linhagens isogênicas parecem ser mais suscetíveis à toxicidade por STZ (RAVELLI *et al.*, 2017), mas representam menos o padrão genético translacional encontrado na natureza. A análise por Western blot demonstrou que a expressão de sinaptofisina diminuiu, mas não significativamente, no córtex pré-frontal após as injeções

de STZ. Em modelos transgênicos e em linhagens isogênicas a diminuição dos níveis de sinapsina e sinaptofisina são evidenciadas ao longo do tempo e são acompanhadas de outros marcadores da DA, como Tau- fosforilada e peptídios A β (XU *et al.*, 2014; RAVELLI *et al.*, 2017).

Curiosamente, Mayer e colaboradores (1990) demonstraram que, após 2 semanas da injeção de STZ, a memória aversiva foi reduzida, mas não foi observado efeito na memória espacial. Outros estudos demonstraram que doses menores de STZ resultam em um déficit cognitivo menor (AGRAWAL *et al.*, 2010; PRICKAERTSET *et al.*, 2000), pois o efeito neurotóxico é progressivo, de longo prazo e dose-dependente (MAYER *et al.*, 1990), então espera-se que em um maior tempo de indução do modelo seja possível observar maiores danos cerebrais (KANDIMALLA *et al.*, 2017; TAOUIS; TORRES-ALEMAN, 2019). Uma maior administração i.c.v pode alcançar o meio intercelular através de outros transportadores, além da GLUT 2, induzindo efeitos tóxicos generalizados (GRUNBLATT *et al.*, 2007) e sugerindo que a STZ tem ações independentes de GLUT 2 e 4 (mais presentes no hipocampo), mas também em GLUT 1 e 3 (mais presentes no córtex).

Está bem documentado que a potenciação a longo prazo (LTP) e a plasticidade sináptica em neurônios são importantes para a aprendizagem e a memória, onde há uma diminuição significativa na densidade sináptica nas áreas de associação neocorticais e do hipocampo na demência (STEPHEN; DOUGLAS, 2003). A perda de sinapses descrita em pacientes com DA pode estar relacionada ao estado cognitivo encontrado nesses pacientes e pode representar uma razão para o declínio da função cognitiva (DEKOSKY; SCHEFF, 1990).

Tais evidências epidemiológicas reforçam a associação entre DMT2 e DAE, sendo que os mecanismos de associação entre elas estão interligados por meio do processo central de resistência à insulina (KANDIMALLA *et al.*, 2017). Neste estudo, foi feita a dosagem da glicemia em todos os animais, sem restrição alimentar, antes dos procedimentos de indução e antes da eutanásia, para confirmar se os animais não estavam diabéticos. Os resultados obtidos demonstraram que não houve nenhuma alteração nos níveis de glicose antes e após os procedimentos de indução com STZ nos grupos experimentais avaliados neste estudo. Essa não alteração corrobora com outros trabalhos (PACHECO *et al.*, 2018; BASSANI, 2017; BEZERRA, 2019), demonstrando que o modelo estudado não influencia no nível basal da glicose sanguínea, não induzindo DM nos animais, e gera uma alteração no metabolismo da glicose apenas a nível de SNC com a resistência insulínica cerebral (SALKOVIC-PETRISIC; HOYER, 2007).

O estado da resistência de insulina cerebral, induzido pela STZ central, vem sendo associado às mudanças morfológicas, moleculares e comportamentais que ocorrem na DAE (LESTER-COLL *et al.*, 2006). Dentre essas mudanças, já foram identificadas alterações nos processos mitocondriais, levando a um processo cíclico de redução da produção de energia e a um aumento das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROIs) e um aumento do estresse no retículo endoplasmático (REL) que desregula o metabolismo lipídico, causando acúmulo de lipídios tóxicos no cérebro (DA SILVEIRA *et al.*, 2021).

Estudos têm demonstrado haver um aumento do estresse oxidativo por meio das dosagens de nitrito, dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da enzima Glutathione peroxidase (GPx) no modelo de DAE por STZ (PACHECO *et al.*, 2018; KUMAR; SINGH, 2017; KUMAR, 2017). Um dos principais componentes celulares afetados pelo estresse oxidativo é a membrana celular que sofre um processo de peroxidação. Por isso, avaliamos a dosagem de MDA (um aldeído de cadeia curta), principal produto da peroxidação lipídica, no córtex pré-frontal (CPF) e no hipocampo dos animais através dos níveis de TBARS (DRAPER; HADELY, 1998).

Nossos resultados demonstraram que o modelo induzido causou um aumento significativo nas concentrações de MDA no córtex pré-frontal (CPF), evidenciando um aumento da peroxidação lipídica e desestabilização da membrana plasmática, consequência da injúria neuronal causada pelo estresse oxidativo induzido por STZ. Outros trabalhos demonstraram esse aumento na peroxidação lipídica com o STZ, gerando H₂O₂ e óxido nítrico, originando espécies reativas de oxigênio (KWON *et al.*, 1994; HE *et al.*, 2019) e nitrogênio (VALKO *et al.*, 2007).

No nosso estudo, o tratamento com o eriodictiol na dose de 4 mg/kg, v.o, apresentou tendência, mas não reduziu significativamente a peroxidação lipídica no hipocampo. Contudo, outros trabalhos demonstraram que os derivados da eritrocina, como o eriodictiol, reduzem os níveis de MDA e outros marcadores de estresse oxidativo em experimentos clínicos e pré-clínicos de DM (MIYAKE *et al.*, 1998; HE *et al.*, 2019; YAO *et al.*, 2022; YUAN *et al.*, 2022; CESAR; RAMOS; RIBEIRO, 2022). No estudo da Diabetes Tipo 3, Li e colaboradores (2022) também identificaram o efeito antioxidante neuroprotetor (redução de MDA em córtex e hipocampo) do eriodictiol (50 mg/kg v.o) após 3 meses de tratamento em camundongos transgênicos (LI *et al.*, 2022). Desse modo, outros experimentos utilizando uma dose maior de eriodictiol devem ser realizados para avaliar se não termos obtido efeito foi por baixa dose do eriodictiol no tratamento desse modelo.

No modelo de indução de DAE por STZ, o aumento da geração de radicais livres e posterior estresse oxidativo são bem relatados quanto à geração de prejuízos ao aprendizado e memória, levando à disfunção cognitiva (ISHRAT *et al.*, 2009). A estrutura química da STZ sugere que este composto também possa produzir óxido nítrico (NO) (RAI *et al.*, 2014). O NO apresenta efeitos protetores, dilatando vasos e dessa maneira aumentando a oferta de glicose e oxigênio, e deletérios reagindo com o radical superóxido formando então o íon peroxinitrito (molécula é extremamente tóxica que danifica proteínas, lipídeos de membrana e DNA) que desencadeia uma cascata de alterações bioquímicas e estruturais com liberação de mediadores inflamatórios, hiperfosforilação da proteína Tau e agregados de peptídeo A β resultando em estresse oxidativo, neuroinflamação e morte celular (DESHMUKH *et al.*, 2009; MEHAN *et al.*, 2011).

Os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram um aumento significativo nas concentrações de NO₂/NO₃ no hipocampo e o tratamento com o eriodictiol (4 mg/kg) foi capaz de prevenir esse dano, corroborando com os resultados de Zhang e colaboradores (2020). Além disso, Li e colaboradores (2020), em um modelo *in vitro* de glioma, observou que o eriodictiol possui efeito antioxidante regulando negativamente a via de sinalização fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K)/Akt/NF- κ B de maneira dependente da concentração.

A estimativa do estresse oxidativo induzido por injeção i.c.v de STZ também é comumente medida em níveis de GSH (glutationa). Fisiologicamente, os níveis de EROs e ERNs são rigidamente controlados por antioxidantes que podem agir como seqüestradores ou “scavenger”, tal como no sistema glutaciona (LU *et al.*, 2011), ou de maneira indireta através do aumento da expressão de enzimas antioxidantes (LU *et al.*, 2011). A glutaciona reduzida (GSH) (SEDLAK; LINDSAY, 1968) é levada à depleção em situações de estresse oxidativo, sendo principalmente observado no hipocampo após 2-3 semanas do protocolo cirúrgico com STZ no mesmo modelo (ISHRAT *et al.*, 2009).

Nesta avaliação, os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram uma redução significativa nas concentrações de GSH no hipocampo e o tratamento com o eriodictiol (4 mg/kg, v.o) foi capaz de prevenir. Assim, o efeito antioxidante do eriodictiol esteve envolvido no seu efeito neuroprotetor contra o dano oxidativo induzido pelo STZ, uma vez que o composto preveniu o tecido cerebral do aumento de EROs e ERNs. Outros flavonoides, como os do mirtilo, a rutina, a silimarina e a puerarina preveniram os déficits de aprendizado e memória em modelos de DAE através da redução da neuroinflamação e do estresse oxidativo (LI *et al.*, 2020; LAU *et al.*, 2007).

Além dos efeitos de estresse oxidativo, o modelo de infusão i.c.v de STZ também tem sido associado a extensa perda de células, neurodegeneração e astrogliose (SONKUSARE *et al.*, 2005; BEZERRA, 2019). Essas alterações morfológicas ocorrem algumas semanas após a injeção e são comparáveis à DA e perduram por períodos ainda indeterminados (SANTOS *et al.*, 2012). Os astrócitos possuem um papel fundamental na manutenção da homeostase cerebral e, em injúria cerebral, são ativados e começam a se proliferar e a se hipertrofiar, processo denominado astrogliose reativa (SWANSON *et al.*, 2004), que pode ser mensurada pelo aumento da expressão de GFAP. A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) é exclusiva dos astrócitos que os diferencia dos demais tipos celulares (OCALLAGHAM; SRIRAM, 2005).

No presente estudo, os animais submetidos ao STZ apresentaram uma astrogliose hipocampal, corroborando com outros autores em ratos (SOUZA *et al.*, 2022) e camundongos (BEZERRA, 2019). Outros modelos de DAE já evidenciaram que déficits cognitivos podem surgir sem astrogliose e microgliose evidente (MACHADO *et al.*, 2020). Além disso, embora já tenha sido evidenciado um efeito preventivo da astrogliose pelo eriodictiol 4 mg/kg i.p no córtex em um modelo de isquemia (FERREIRA *et al.*, 2016), o tratamento com eriodictiol na mesma dose não diminuiu significativamente essa astrogliose no modelo de DAE.

Esse resultado pode ser embasado, tanto na diferença entre os modelos estudados, como, provavelmente, pela via de administração utilizada, pois é sabido que a biodisponibilidade via oral é menor do que na via intraperitoneal. Na literatura, o efeito protetor da gliose nesse modelo também parece estar associado a uma ação anti-colinesterásica dose-dependente (SONKUSARE *et al.*, 2005; BEZERRA, 2019) que não foi avaliada nesse estudo.

Assim, se fez necessário dar continuidade a este estudo para entender de forma mais detalhada outras bases moleculares da ação do eriodictiol envolvida na neuroproteção por STZ, bem como, conhecer a sua possível relação com as vias promotoras de neuroproteção relacionadas à resistência à insulina, que ajudaram a elucidar os seus efeitos sobre a cognição, especificamente, sobre a aprendizagem e a memória.

Nesse contexto, o uso de metodologias computacionais tem se tornado cada vez mais importantes, pois essa aplicação tem oferecido um excelente suporte para o desenvolvimento e identificação de novas terapias farmacológicas. Os ensaios *in silico* do presente estudo foram realizados objetivando a avaliação da atividade do eriodictiol e foram conduzidos em parceria com a FIOCRUZ- CE, sob a supervisão do Professor Dr. João Hermínio Martins da Silva.

Com os resultados dos estudos de *docking* foi realizada uma avaliação mais detalhada por Dinâmica Computacional para identificar as possíveis interações eriodictiol-

proteína-alvo. Inicialmente, foi realizado um “screening” virtual para identificar as afinidades de ligação do eriodictiol com os principais alvos moleculares descritos na literatura em experimentos *in vivo* correlacionados à Doença de Alzheimer. As orientações e conformações de poses foram classificadas (ranqueadas) de acordo com as funções de escore empíricas, baseadas na mecânica molecular.

Na identificação de possíveis alvos do eriodictiol, a busca de proteínas com estrutura de boa resolução computacional, resultou na obtenção de dez alvos proteicos de interesse (GSK3 β , Keap1, apoE3, MAPK, PPAR γ , IGFR1, SYN, IRS1, TLR4 e PI3K). O *docking* cego ranqueou, de forma qualitativa, o potencial de interação destas ao eriodictiol e todas tiveram valores de afinidade predita similares. Contudo, por otimização experimental, optou-se por utilizar três proteínas-alvo (IRS-1, GSK3B e KEAP1) nas demais avaliações estruturais para as avaliações subsequentes de suas cavidades, docking dirigido e dinâmica molecular.

A literatura tem destacado que o eriodictiol pode ser um potente secretagogo de insulina em comparação a outros compostos naturais (HAMEED *et al.*, 2018). Esse efeito insulino-trópico, provavelmente se deve ao aumento da secreção de insulina dose-dependente em modelos diabéticos e não-diabéticos *in vivo* e *in vitro* envolvendo a ativação da cascata de sinalização da proteína quinase A (PKA), levando à exocitose de insulina (SHIBASAKI *et al.* 2014; HAMEED *et al.*, 2018). Além disso, o tratamento crônico com eriodictiol reduziu a glicose no sangue em ratos modelo DMT2, sugerindo que o eriodictiol tem um papel terapêutico na condição diabética tipo 2 não obesa (HAMEED *et al.*, 2018).

Os IRSs são expressos nos sistemas periféricos, assim como no SNC, especialmente no hipocampo, primeira estrutura afetada na DA. No encéfalo, os oligômeros amiloides levam à ativação anormal do TNF- α via c-Jun-quinase N-terminal (JNK), inibindo IRS1 e interrompendo a sinalização da insulina (DA SILVEIRA *et al.*, 2021). Em relação a interação do eriodictiol com o receptor de insulina tipo 1 (IRS1), foi observado que o eriodictiol interage prioritariamente em três regiões no *docking*, porém, na dinâmica molecular, evidenciou-se que nenhuma das poses testadas indicam a ocorrência de convergência entre as simulações. Tais resultados são pioneiros e apontam para o não reconhecimento apropriado do ligante eriodictiol pela proteína IRS1, ou seja, o efeito neuroprotetor do eriodictiol parece não atuar diretamente sobre o receptor de insulina. Esse resultado corrobora com um estudo *in silico* que sugere que o eriodictiol atua na cascata de sinalização do cAMP via PKA e não por meio da cascata de sinalização intracelular do IRS1 (HAMEED *et al.*, 2018).

Resumidamente, a insulina, além do seu envolvimento periférico no metabolismo da glicose, também atua modulando cognição, memória e plasticidade sináptica através das vias associadas ao complexo insulina/receptor tirosina quinase. Além disso, dados de estudos *post mortem* tem demonstrado uma diminuição do conteúdo de insulina e da expressão dos seus receptores no córtex e hipocampo, bem como aumento de GSK3 β (STEEN *et al.*, 2005). Por isso, pesquisadores tem demonstrado interesse na descoberta de inibidores de GSK3 β visando maior especificidade e eficácia.

Uma das características benéficas do método de *docking* é a capacidade de reproduzir modos de ligação semelhantes aos observados experimentalmente. No nosso estudo, comparamos o flavonoide morina complexado a GSK3 β (PDB ID: 6AE3) para avaliação do eriodictiol no sítio ligante da proteína (KIM *et al.*, 2018). Dessa forma, ao comparar os resultados das simulações da proteína livre e dos complexos com o eriodictiol, é possível sugerir que a presença do ligante levou a uma restrição conformacional em GSK3 β , mas ainda é necessário a extensão do tempo de simulação para confirmar a estabilidade da interação GSK3 β -eriodictiol.

A avaliação das ligações de hidrogênio identificou uma interação polar presente em todas as replicatas das duas poses com Asp133, apontando este resíduo como âncora principal da molécula. Tal interação parece desencadear alterações na flexibilidade e no perfil de conformações adotados pela GSK3 β ao longo da simulação que podem levar a inibição de sua atividade de quinase, como foi observado com a morina (KIM *et al.*, 2018). Assim, podemos sugerir que o eriodictiol interage com GSK3 β de forma estável e exerce um efeito inibidor prevenindo a fosforilação de Tau e, conseqüentemente, a exarcebação do processo neurodegenerativo na DAE induzido por STZ.

Atualmente é intensamente estudado que a ativação da sinalização Keap1-Nrf2-ARE pode fornecer proteção contra várias doenças relacionadas ao estresse e à inflamação, incluindo doenças neurodegenerativas, pois essa via é o melhor mecanismo de defesa celular que controla o dano xenobiótico e o estresse oxidativo. Além disso, a via Keap1-Nrf2-ARE também está envolvida no início de várias vias que mantêm o metabolismo e o equilíbrio redox intracelular, controlando um grupo de proteínas citoprotetoras ao nível da transcrição celular (CUADRADO *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, muitos esforços foram feitos para desenvolver potentes inibidores de Keap1-Nrf2 com novas estruturas químicas de diferentes potências (MOU *et al.*, 2020). Outros estudos destacaram que esses compostos podem imitar a forma intrínseca da ativação da Nrf2 e interagir com os resíduos reativos em Keap1 (HUR; GRAY, 2011).

Vários estudos relataram que o eriodictiol tem efeitos neuroprotetores em diversos modelos *in vitro* e *in vivo* por meio de mecanismos endógenos de defesa antioxidante e anti-inflamatória via Keap1-Nrf2-ARE (LOU *et al.*, 2012; JING *et al.*, 2015; HE *et al.*, 2019; LV *et al.*, 2019; DENG *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2022; JING *et al.*, 2013; AL-KHAYRI *et al.*, 2022; HABTEMARIAM, 2019; AL-ISHAQ *et al.*, 2019). Além disso, o eriodictiol aliviou o estresse oxidativo induzido por LPS via Nrf2/Keap1 *in vivo* e *in vitro* (He *et al.*, 2019).

Nos nossos estudos *in silico* foi observado que o eriodictiol pode interagir em duas regiões do Keap1. Vale ressaltar que, na região 1, usamos a informação experimental de Davies e colaboradores (2016) na qual o inibidor ligante ácido 3-(4-clorofenil) propanoico está co-cristalizado com Keap1 (PDB ID: 5FNQ) para os testes com o eriodictiol. Dessa forma, os modos de ligação obtidos nas simulações foram comparados com o modo obtido experimentalmente do complexo ácido 3-(4-clorofenil) propanoico e Keap1.

Além disso, Davies e colaboradores (2016) demonstraram o uso de uma abordagem baseada em fragmentos para direcionar a interação Keap1-Kelch-Nrf2, onde em sua triagem cristalográfica de raios-X identificou três “pontos quentes” distintos dentro do bolso de ligação do Nrf2 do Keap1, permitindo a identificação farmacológica de moléculas que diminuem a ubiquitinação de Nrf2 por meio da modificação de resíduos de Keap1. O ácido 3-(4-clorofenil) propanoico é um composto líder promissor que exhibe ligação forte e seletiva a Keap1 e ativa a resposta antioxidante Nrf2 em modelos celulares e animais, fornecendo uma sonda química de alta qualidade para explorar o potencial terapêutico de interromper a interação Keap1-Nrf2.

A sobreposição entre os modos de ligação do eriodictiol com o ácido 3-(4-clorofenil) propanoico demonstrou que o eriodictiol explora, de forma estável, interações favoráveis do sítio de inativação do Keap1, evidenciando o espaço químico (na entrada da cavidade em formato de túnel) que pode ser identificado no complexo com outros possíveis inibidores da proteína (DAVIES *et al.*, 2016).

Corroborando com esse resultado, estudos de Zeng e colaboradores (2021) indicaram que o tratamento com eriodictiol-7-O-glicosídeo (E7G) fosforila o resíduo Ser40, que está localizado no domínio N-terminal Neh2 de Nrf2 (domínio que interage com Keap1 no citoplasma). Assim, quando esse aminoácido é fosforilado, o Nrf2 é liberado de Keap1, translocado para o núcleo e, então, regula o estresse oxidativo através de múltiplas vias (ZENG *et al.*, 2021). Dessa forma, o E7G (análogo do eriodictiol) é considerado um novo ativador da via Nrf2-Keap1, garantindo neuroproteção para lesão isquêmica cerebral.

Nesse estudo, nas simulações em todas as poses escolhidas para o eriodictiol, na região 1, a molécula é ancorada por interações com a Arg92 e com a Ser40 ou Ile93, onde a

presença do eriodictiol parece não afetar significativamente o espaço conformacional amostrado por Keap1. Na região 2, localizada no centro do túnel, as principais interações são estabelecidas com a Val142, Leu234 e Thr237 e é possível observar tanto um possível efeito de restrição quanto de expansão conformacional. Portanto, é possível sugerir que o eriodictiol pode interagir de forma estável com Keap1 na entrada do túnel (região 1) e o mesmo parece causar alterações conformacionais ao interagir na região mais interna da cavidade (região 2).

Tendo em vista a existência de informações experimentais da inibição de Keap1 pela interação com a sonda química de alta qualidade para explorar o potencial terapêutico de interromper a interação Keap1-Nrf2 (DAVIES *et al.*, 2016) e da translocação do Nrf2 para o núcleo por fosforilação de Ser40 pelo E7G (análogo do eriodictiol), é possível inferir que o eriodictiol exerça sua atividade biológica por mecanismo similar. Assim, podemos sugerir que o eriodictiol consegue interagir com a proteína Keap1 de forma estável e exerce um efeito ativador da via Nrf2, desencadeando a ativação de genes Nrf2/ARE e prevenindo a exarcebação do processo neurodegenerativo intracelular na DAE induzido por STZ.

O Nrf2 estimula a transcrição de genes que expressam a Glutathione peroxidase (GPx) que é crucial para a sobrevivência celular, metabolismo e homeostase redox (OH; JUN, 2017). A GPx são as principais enzimas responsáveis pela remoção de peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois às custas da conversão de GSH a GSSG (FERREIRA & MATSUBA, 1997). Desse modo, a possível ativação da via Keap1-Nrf2 pelo eriodictiol corrobora com o resultado experimental observado pelo aumento de GSH no hipocampo dos animais STZ tratados com eriodictiol.

Assim, o eriodictiol pode ser uma estratégia terapêutica promissora no desenvolvimento de antioxidantes moduladores da inflamação que atuam como agentes preventivos ou terapêuticos para condições de doença que envolvem estresse oxidativo e inflamação como na Diabetes e na Doença de Alzheimer.

É conhecido que os flavonoides e seus metabólitos são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (KALT *et al.*, 2008; ANDRES-LACUEVA *et al.*, 2005) e podem exercer ações neurofarmacológicas a nível molecular, influenciando vias de sinalização e expressão gênica (WILLIAMS *et al.*, 2004; SPENCER, 2008). Também é sugerido pela literatura que, devido ao seu efeito dependente de glicose *in vitro* e *in vivo*, e ausência de efeito hiperglicêmico, o eriodictiol possa servir como um forte candidato a medicamento para futuras pesquisas diabéticas e como uma boa alternativa terapêutica a outros secretagogos de insulina, incluindo as sulfoniluréias.

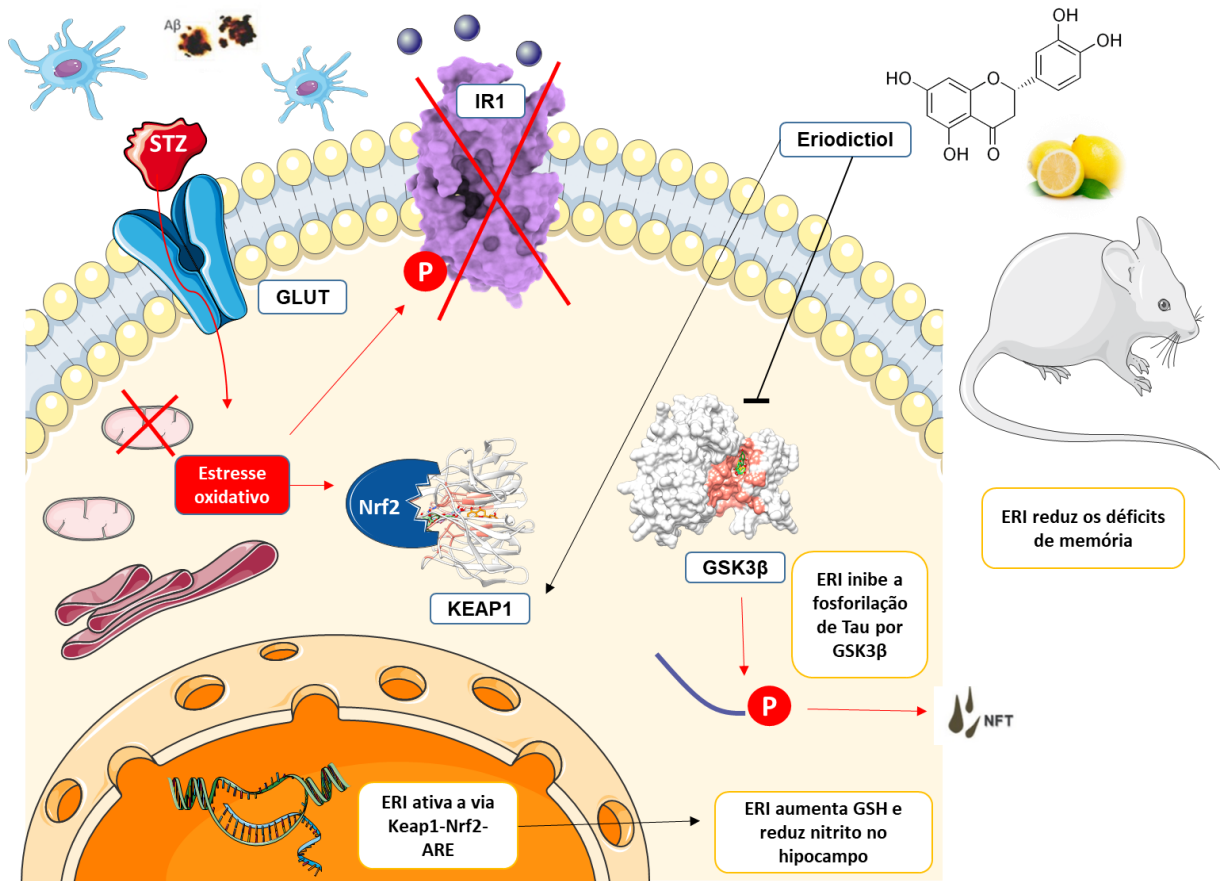
Uma vez que a atividade estimuladora de insulina do eriodictiol ocorre apenas em altas concentrações de glicose, é provável que o eriodictiol exiba um risco reduzido de hipoglicemia induzida por drogas, como observado nas sulfoniluréias (HAMEED *et al.*, 2018). Assim, o eriodictiol é uma substância que pode ser testada em humanos, pois possui baixa toxicidade e é amplamente distribuído em frutas cítricas, sendo uma molécula promissora para a pesquisa translacional na DA.

Curiosamente, em uma pesquisa translacional de longo prazo (início em 1997), pesquisadores do Projeto Memória e Envelhecimento do RADC adquiriram informações dietéticas completas durante o acompanhamento e autópsias cerebrais de 575 pacientes com DA, cuja média a idade do óbito foi de 91,3 anos. Os dados sugerem que a antocianina pelargonidina, presente em frutas vermelhas, pode proteger o cérebro envelhecido do desenvolvimento da DAE, pois ao longo do tratamento, os pacientes tiveram melhora na memória episódica, memória de trabalho, memória semântica, capacidade visuoespacial e velocidade perceptiva e apresentaram menos neurofilamentos e perda sináptica (RUSH, 2022). De acordo com os autores, isso motiva uma mudança simples que qualquer pessoa pode fazer em sua dieta na busca por saúde, pois mostra que fazer escolhas alimentares específicas pode levar a uma neuroproteção e uma taxa mais lenta de declínio cognitivo.

Entende-se que a DA é uma doença neurodegenerativa ainda bastante incompreendida e suas múltiplas vias patológicas contribuem para a complexidade e dificuldade de tratamento e prevenção desta doença. Este trabalho apresentou bases moleculares e sinalizações intracelulares envolvidas em duas importantes doenças degenerativas crônicas, a DM e DA, destacando a importância para a compreensão da relação entre as duas patologias e a hipótese da Doença de Alzheimer por Diabetes Tipo 3 (Figura 57).

Uma vez que ainda não há cura para a DA, o maior desafio está no desenvolvimento de novas terapias e/ou alvos terapêuticos para cura ou tratamento sintomático da doença. Assim, o entendimento molecular apresentado pode favorecer e permitir o desenho de novos fármacos, ou estabelecer novos tratamentos que possam retardar ou bloquear a progressão da DAE, com aumento da sobrevida dos pacientes, melhora na sua qualidade de vida e benefícios para a saúde pública.

Figura 57 - Síntese do mecanismo de ação protetor do eriodictiol em modelo de DAE por STZ



Fonte: Elaborado pelo autor. Setas em vermelho destacam a ação da estreptozotocina (STZ) e em preto a do eriodictiol neste estudo.

7 CONCLUSÕES

Este estudo é pioneiro em reportar evidências pré-clínicas do efeito neuroprotetor do eriodictiol sobre o estresse oxidativo, a neuroinflamação e os déficits de memória em camundongos submetidos ao modelo de DAE pela hipótese do Diabetes Tipo 3. Assim, podemos resumir as conclusões deste trabalho, de modo que:

- O eriodictiol protege contra a neurotoxicidade induzida pelo STZ em um modelo experimental da Doença de Alzheimer Esporádica (DAE), observada pela diminuição dos déficits de memória causados pela doença;
- O efeito neuroprotetor do eriodictiol, provavelmente se deve a uma ação antioxidante e anti-inflamatória via inativação do GSK-3B e ativação da via Keap1/Nrf2 que preveniu a redução de GSH e diminuiu os níveis nitrito/nitrato, consequentemente, atenuando o processo da neuroinflamação e da resistência à insulina;
- O eriodictiol pode ser uma estratégia terapêutica adjuvante promissora para o tratamento da DA.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

A terapia combinada com antioxidantes pode levar a melhores resultados para pacientes com resistência à insulina e pode chegar à prática clínica com maior compreensão dos mecanismos que eles empregam (HURRLE; HSU, 2017). Uma dieta variada e nutritiva pode ser empregada como medida preventiva para a saúde metabólica e como um complemento ao tratamento de Síndromes Metabólicas, seja de Diabetes Mellitus, Obesidade, Doença de Alzheimer ou Diabetes Tipo 3.

Como futuros experimentos que podem suprir interrogações no atual trabalho, sugerimos:

- Estudar o efeito do STZ em um modelo de longo prazo de indução;
- Avaliar uma maior dose-resposta do eriodictiol no modelo animal de DAE por STZ;
- Comparar o tratamento com o eriodictiol com um fármaco antidiabético comercial e seu efeito sinérgico;
- Avaliar a expressão de GSK3 β , Keap1 e outras proteínas-alvo identificadas na literatura de ação do eriodictiol no córtex e hipocampo dos camundongos.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, P. *et al.* Pelargonidin and Berry Intake Association with Alzheimer's Disease Neuropathology: A Community-Based Study. 1 Jan. 2022 : 653-661.

AGHOLME, L. *et al.* Proteasome inhibition induces stress kinase dependent transport deficits—Implications for Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci*, v.58, p.29-39, 2014.

AGRAWAL, A. D. Pharmacological activity of flavonoids: A Review. *Int. J. Pahraceut. Sci. Nano.* v 4, 2011.

AGUIRRE, E.; SPECTOR A.; ORRELL, M. Guidelines for adapting cognitive stimulation therapy to other cultures. *Clin Interv Aging*. 2014;9:1003-7. doi:10.2147/ CIA.S61849.

ALEXANDER, G.; CRUTCHER, M. D. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.*, v. 13, n. 8, p. 266-271, 1990.

AL-ISHAQ R. K. *et al.* Flavonoids and their anti-diabetic effects: Cellular mechanisms and effects to improve blood sugar levels. *Biomolecules.* v 9, n 430, 2019.

AL-ISHAQ, R. K. *et al.* Flavonoids and their anti-diabetic effects: Cellular mechanisms and effects to improve blood sugar levels. *Biomolecules*, v. 9, n. 9, p. 430, 2019.

AL-KHAYRI, J. M. *et al.* Flavonoids as potential anti-inflammatory molecules: A review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 27, n. 9, p. 2901, 2022.

AL-KHAYRI, J. M. *et al.* Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review. *Molecules* 2022, 27, 2901. <https://doi.org/10.3390/ molecules27092901>.

AL-KHAYRI, J. M. *et al.* Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review. *Molecules.* v. 27, n. 9, Maio 2022.

ALKON, D. L. *et al.* Protein synthesis required for long-term memory is induced by PKC activation on days before associative learning. *Proc Natl Acad Sci*, v.102, p.16432-16437, 2005.

ALKONDON, M. *et al.* Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates γ -aminobutyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* v.283, p.1396-1411, 1997.

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Medicinal research reviews*, v. 26, n. 5, p. 531-568, 2006.

ASCHNER, M. *et al.* Glial cells in neurotoxicity development. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, v. 39, p. 151-173, 1999.

ATRI, A. The Alzheimer's disease clinical spectrum: Diagnosis and management. *The Medical clinics of North America*, v. 103, n. 2, p. 263–293, 2019.

- ATTWELL, D.; IADECOLA, C. The neural basis of functional brain imaging signals. *Trends Neurosci*, v. 25, n. 12, p. 621-5, Dec 2002.
- AWAN, F. T. *et al.* A phase 1 clinical trial of flavopiridol consolidation in chronic lymphocytic leukemia patients following chemoimmunotherapy. *Annals of hematology*, v. 95, n. 7, p. 1137–1143, 2016.
- BABRI, S. *et al.* Effect of Aggregated β -Amyloid (1-42) on Synaptic Plasticity of Hippocampal Dentate Gyrus Granule Cells in Vivo. *Bioimpacts*, v.2, n.4, p. 189–194, 2012.
- BABRI, S. *et al.* Effect of troxerutin on synaptic plasticity of hippocampal dentate gyrus neurons in a β -amyloid model of Alzheimer's disease: An electrophysiological study. *European Journal of Pharmacology*, v.732, p.19-25, 2014.
- BABRI, S. *et al.* Protective effects of troxerutin on β -Amyloid (1–42)-induced impairments of spatial learning and memory in rats. *Neurophysiology*, v.44, p.387–393, 2012b.
- BANERJEE, S. *et al.* Study of mirtazapine for agitated behaviours in dementia (SYMBAD): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2021;398(10310):1487-97. doi:10.1016/S0140-6736(21)01210-1.
- BATISTUZZO, J. A. O.; ITAYA, M.; ETO, Y. *Formulário Médico Farmacêutico*. 3. Ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006.
- BEZERRA, J. R. O α -bisabolol protege camundongos da perda neuronal e déficits cognitivos em modelo animal de doença de alzheimer esporádica induzido por estreptozotocina. 2019. 111 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.
- BHAT, R. V.; BUDD HAEBERLEIN, S. L.; AVILA, J. Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies: Therapeutic target GSK3. *Journal of neurochemistry*, v. 89, n. 6, p. 1313–1317, 2004.
- BISHT, K.; SHARMA, K.; TREMBLAY, M.-È. Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease: Roles of microglia-mediated synaptic remodeling, inflammation, and oxidative stress. *Neurobiology of stress*, v. 9, p. 9–21, 2018.
- BLENNOW, K.; DE LEON, M. J.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. *Lancet* 368 (9533):387-403, 2006.
- BLISS, T. V. P.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic modelo of memory: long-term potentiation. *Nature*. v. 361, p. 31-39, 1993.
- BLOKLAND, A.; JOLLES, J. Behavioral and biochemical effects of an ICV injection of streptozotocin in old Lewis rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 47:833–837, 1994.
- BRAZIL, D. P.; YANG, Z. Z.; HEMMINGS, B. A. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci*. v.29, p.233-242, 2004.
- BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in the rat. I. Situational factors. *Br. J. Psychol*, v.48, p.1-12, 1957.

BRUCKI, S. M. D. *et al.* Cannabinoids in Neurology – Position paper from Scientific Departments from Brazilian Academy of Neurology. *Arq Neuropsiquiatr.* 2021;79(4):354-69. doi:10.1590/0004-282X-ANP-2020-0432.

Bucolo, C., Leggio, G.M., Drago, F., Salomone, S., 2012. Eriodictyol prevents early retinal and plasma abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochemical pharmacology* 84, 88-92.

BURGUILLOS, M. A. *et al.* Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature*, v.472, p.319–324, 2011.

CANNING, P.; SORRELL, F. J.; BULLOCK, A. N. Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2, *Free Radic. Biol. Med.*, 88 (2015) 101-107.

CARAMELLI, P. *et al.* Tratamento da demência: recomendações do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. *Dementia & neuropsychologia*, v. 16, n. 3 suppl 1, p. 88–100, 2022.

CARRION, C. *et al.* Cognitive therapy for dementia patients: a systematic review. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2018;46(1-2):1-26. doi:10.1159/000490851.

CASTORA, F. J. *et al.* Expression changes in mitochondrial genes affecting mitochondrial morphology, transmembrane potential, fragmentation, amyloidosis, and neuronal cell death found in brains of Alzheimer's disease patients. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, v. 90, n. 1, p. 119–137, 2022.

CAVALLI, A. *et al.* A computational study of the binding of propidium to the peripheral anionic site of human acetylcholinesterase. *Journal of medicinal chemistry*, v. 47, n. 16, p. 3991-3999, 2004.

CEREJEIRA, J.; LAGARTO, L.; MUKAETOVA-LADINSKA, E. B. Behavioral and psychological symptoms of dementia. *Frontiers in neurology*, v. 3, p. 73, 2012.

CESAR, T. B.; RAMOS, F. M. M.; RIBEIRO, C. B. Nutraceutical eriocitrin (Eriomin) reduces hyperglycemia by increasing glucagon-like peptide 1 and downregulates systemic inflammation: A crossover-randomized clinical trial. *Journal of medicinal food*, v. 25, n. 11, p. 1050–1058, 2022.

CHEN, J.; WANG, J. NMR Structure of full length apoE3. Worldwide Protein Data Bank, 3 ago. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2210/pdb217b/pdb>

CHEN, Y. *et al.* Beneficial effects of natural flavonoids on neuroinflammation. *Front Immunol.* v. 24, n.13, Out. 2022.

CHENG, C. M. *et al.* Tau is hyperphosphorylated in the insulin-like growth factor-I null brain. *Endocrinology*, v. 146, n. 12, p. 5086–5091, 2005.

CHENG, Y. *et al.* Neuroprotective effect of baicalein against MPTP neurotoxicity: Behavioral, biochemical and immunohistochemical profile. *Neurosci. Lett.*, v.441, p.16-20, 2008.

CHOBOT, V. et al. Pro- and antioxidant activity of three selected flavan type flavonoids: Catechin, eriodictyol and Taxifolin. *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 12, p. 1986, 2016.

CHOY, K. W. *et al.* Flavonoids as Natural Anti-Inflammatory Agents Targeting Nuclear Factor-Kappa B (NFκB) Signaling in Cardiovascular Diseases: A Mini Review. *Front. Pharmacol.* v.10, 2019.

COHEN, P.; GOEDERT, M. GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 3, n. 6, p. 479–487, 2004.

CONVERY, M. A. *et al.* PI3K delta in complex with 2methoxyN[2methoxy5(7[(2R)4(oxetan3 yl)morpholin2yl]methoxy1,3dihydro2 benzofuran5yl)pyridin3yl]ethane1 sulfonamide. *Worldwide Protein Data Bank*, 1 jan. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2210/pdb6tns/pdb>

COOKSON, M. R.; PENTREATH, V. W. Alterations in the glial fibrillary acidic protein content of primary astrocyte cultures for evaluation of glial cell toxicity. *Toxic In vitro* v.8, p.351-359, 1994.

CORREIA, S.; SANTOS, R.; PERRY, G.; ZHU, X.; MOREIRA, P.; SMITH, M. Insulin resistant brain state: the culprit in sporadic alzheimer's disease? *Ageing Research Reviews*, v. 10, n. 2, p. 264–273, 2011

CRANE, P. K.; WALKER, R.; HUBBARD, R. A.; LI, G.; NATHAN, D. M.; ZHENG, H.; HANEUSE, S.; CRAFT, S.; MONTINE, T. J.; KAHN, S. E.; MCCORMICK, W.; MCCURRY, S. M.; BOWEN, J. D.; LARSON, E. B. Glucose levels and risk of dementia. *N Engl J Med* 369:540–548, 2013.

CUADRADO, A. *et al.* Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 18, n. 4, p. 295–317, 2019.

CUADRADO, A. *et al.* Transcription Factor NRF2 as a Therapeutic Target for Chronic Diseases: A Systems Medicine Approach, *Pharmacol. Rev.*, 70 (2018) 348-383.

D'AMELIA, V. *et al.* The antioxidant properties of plant flavonoids: Their exploitation by molecular plant breeding. *Phytochem.* v. 17, p. 611–625. Abr 2018.

DA SILVEIRA, A. A. *et al.* Diabetes mellitus tipo 2 no desencadeamento da Doença de Alzheimer. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. 13, n. 2, p. e5174, 2021.

DAVIES, D. A.; ADLIMOGHADDAM, A.; ALBENSI, B. C. Role of Nrf2 in synaptic plasticity and memory in Alzheimer's disease. *Cells (Basel, Switzerland)*, v. 10, n. 8, p. 1884, 2021.

DAVIES, S. J. *et al.* Sequential drug treatment algorithm for agitation and aggression in Alzheimer's and mixed dementia. *J Psychopharmacol.* 2018;32(5):509-23. doi:10.1177/0269881117744996.

DAVIES, T. G. *et al.* Structure of the Keap1 Kelch domain in complex with a small molecule inhibitor. Worldwide Protein Data Bank, 13 abr. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2210/pdb5fnq/pdb>.

DE FELICE, F. G.; LOURENCO, M. V.; FERREIRA, S. T. How does brain insulin resistance develop in Alzheimer's disease?. *Alzheimer's & Dementia*, v. 10, n. 1, p. S26-S32, 2014.

De La MONTE, S. M. Insulin resistance and Alzheimer's disease. *BMB Rep.* ;42(8):475–481, 2009.

De La MONTE, S. M. Type 3 diabetes is sporadic Alzheimer's disease: mini-review. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 24, n. 12, p. 1954-60, Dec 2014. ISSN 1873-7862.

DE LUNA, S. L.; RAMIREZ-GARZA, R. E.; SALDIVAR, S. O. S. Environmentally friendly methods for flavonoid extraction from plant material: Impact of their operating conditions on yield and antioxidant properties. *Sci. World J.* 2020. ID 6792069. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7474796/>

DE LUNA, S. L.; RAMIREZ-GARZA, R. E.; SALDIVAR, S. O. S. Environmentally friendly methods for flavonoid extraction from plant material: Impact of their operating conditions on yield and antioxidant properties. *Sci. World J.* 2020. ID 6792069. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7474796/>

DE NOBLE, V. J. *et al.* Vinpocetine: nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits of a step-through passive avoidance response in rats. *Pharmac. Biochem. Behav.*, v. 24: p. 1123-1128, 1986.

DEGENHARDT, T. P. *et al.* Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Kidney international*, v. 61, n. 3, p. 939–950, 2002.

DENG, Z. *et al.* Pharmacological activity of eriodictyol: The major natural polyphenolic flavanone. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, v. 2020, p. 6681352, 2020.

DHE-PAGANON *et al.* Crystal structure of the pleckstrin homology-phosphotyrosine-binding (PH-PTB) targeting region of insulin receptor substrate 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1999.

DIAS, M. C. *et al.* Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*, v. 26, n. 17, Sep. 2021.

D'MELLO, C.; LE, T.; SWAIN, M. G. Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor- α signaling during peripheral organ inflammation. *J Neurosci*, v.29, p.2089-2102, 2009.

DONG, Y.; BREWER, G. J. Global metabolic shifts in age and Alzheimer's disease mouse brains pivot at NAD⁺/NADH redox sites. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, v. 71, n. 1, p. 119-140, 2019.

- DOYON, J.; PENHUNE, V.; UNGERLEIDER, L. G. Distinct contribution of the cortico-striatal and cortico-cerebellar systems to motor skill learning. *Neuropsychologia*, v.41, p.252-262, 2003.
- DRAPER, H. H.; HADELY, M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation, *Meth. Enzymol.* 186: 421-431, 1990.
- DREVER, B. D.; RIEDEL, G.; PLATT, B. The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behavioural brain research*, v. 221, n. 2, p. 505–514, 2011.
- DUBEY, H.; GULATI, K.; & RAY, A. Amelioration by nitric oxide (NO) mimetics on neurobehavioral and biochemical changes in experimental model of Alzheimer's disease in rats. *NeuroToxicology*, 66, 58–65., 2018.
- DUDAI, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol*, v.55, p.51-86, 2004.
- DUDAI, Y.; MORRIS, R. G. M. Memorable trends. *Neuron*, v. 80, n. 3, p. 742–750, 2013.
- DUELLI, R. et al. Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. *Int J Dev Neurosci*, v. 12, n. 8, p. 737-43, Dec 1994. ISSN 0736-5748.
- DUELLI, R.; KUSCHINSKY, W. Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. *News Physiol Sci*, v. 16, p. 71-6, Apr 2001.
- DZOYEM, J. P. et al. Anti-inflammatory and anticholinesterase activity of six flavonoids isolated from *Polygonum* and *Dorstenia* species. *Archives of pharmacal research*, v. 40, n. 10, p. 1129–1134, 2017.
- EILEEN DOLAN, M. Inhibition of DNA repair as a means of increasing the antitumor activity of DNA reactive agents. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 26, n. 2-3, p. 105-118, Jul 07 1997.
- ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain. Res.*, v. 31, n. 1, p. 47-59, 1988.
- ERICSON, E.; SAMUELSSON, J.; AHLENIUS, S. Photocell measurements of rat motor activity. A contribution to sensitivity and variation in behavioral observations. *J Pharmacol Methods*, v.25, p.111-122, 1991.
- ERICSSON, K. A.; KINTSCH, W. Long-term working memory. *Psychological review*, v. 102, n. 2, p. 211–245, 1995.
- ESMAEELPANAHI, E.; RAZAVI, B. M.; HOSSEINZADEH, H. Green tea and metabolic syndrome: A 10-year research update review. *Iranian journal of basic medical sciences*, v. 24, n. 9, p. 1159–1172, 2021.
- FAKHRI, S. *et al.* Attenuation of Nrf2/Keap1/ARE in Alzheimer's disease by plant secondary metabolites: A mechanistic review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 25, n. 21, p. 4926, 2020.

FARID, R. *et al.* Pycnogenol supplementation reduces pain and stiffness and improves physical function in adults with knee osteoarthritis. *Nutrition research (New York, N.Y.)*, v. 27, n. 11, p. 692–697, 2007.

FARZAEI, M. H. *et al.* Inflammation by Flavonoids: Novel Therapeutic Strategy for Metabolic Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* v. 20, n. 4957, 2019.

FERAGALLI, B. *et al.* Pycnogenol®: supplementary management of symptomatic osteoarthritis with a patch. An observational registry study. *Minerva endocrinologica*, v. 44, n. 1, p. 97–101, 2019.

FERRAZ, C. R. *et al.* Therapeutic potential of flavonoids in pain and inflammation: Mechanisms of action, pre-clinical and clinical data, and pharmaceutical development. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 25, n. 3, p. 762, 2020.

FERREIRA, E. de O. Eriodictiol protege camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente, do dano neuronal, déficit de memória e resposta inflamatória / Emerson de Oliveira Ferreira. – 2015. 92 f. : il. color.

FERREIRA, E. de O. *et al.* Neuroinflammatory response to experimental stroke is inhibited by eriodictyol. *Behavioural Brain Research* **JCB**, v. 312, p. 321-332, 2016.

FERREIRA, L. S. S. *et al.* Insulin resistance in Alzheimer's disease. *Frontiers in neuroscience*, v. 12, p. 830, 2018.

FERRETTI, C. E. L.; NITRINI, R.; BRUCKI, S. M. D. Indirect cost with dementia: A Brazilian study. *Dementia & neuropsychologia*, v. 9, n. 1, p. 42–50, 2015.

FILIPPINI, T. *et al.* Green tea (*Camellia sinensis*) for the prevention of cancer. *Cochrane database of systematic reviews*, v. 3, n. 11, p. CD005004, 2020.

FISHER, C. Y. *et al.* Skeletal muscle signaling associated with impaired glucose tolerance in spinal cord-injured men and the effects of contractile activity. *J Appl Physiol*, v. 115, n.5, p. 756–764, 2013.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, v. 33, n. 12, p. 1061-1080, 1995.

FRAGA, C. G. *et al.* The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct.* v. 10, p. 514–528, 2019.

FRANCO, R.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Successful therapies for alzheimer's disease: why so many in animal models and none in humans? *Frontiers in Pharmacology*, v. 5, n. 146, 2013.

GABBOUJ, S. *et al.* Altered insulin signaling in Alzheimer's disease brain - special emphasis on PI3K-Akt pathway. *Frontiers in neuroscience*, v. 13, p. 629, 2019.

GALLUCCINETO, J.; TAMELINI, M. G.; FORLENZA, O. V. Diagnóstico diferencial das demências. *Revista de psiquiatria clinica*, v. 32, n. 3, p. 119–130, 2005. GANDHI, G. R. *et al.*

Citrus flavonoids as promising phytochemicals targeting diabetes and related complications: A systematic review of in vitro and in vivo studies. *Nutrients*, v. 12, n. 10, p. 2907, 2020.

GARCÍA-LAFUENTE, A. *et al.* Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in câncer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, v. 58, p. 537-552, 2009.

GAUTHIER S, WEBSTER C, SERVAES S, MORAIS JA, ROSA-NETO P. 2022. *World Alzheimer Report 2022: Life after diagnosis: Navigating treatment, care and support*. London, England: Alzheimer's Disease International.

GBD 2019 DEMENTIA FORECASTING COLLABORATORS. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The lancet. Public health*, v. 7, n. 2, p. e105–e125, 2022.

GENHEDEN, S.; RYDE, U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert opinion on drug discovery*, v. 10, n. 5, p. 449-461, 2015.

GOATE, A. Segregation of a missense mutation in the amyloid beta-protein precursor gene with familial alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers Disease*, v. 9, n. 3, p. 341–347, 2006.

GODDARD, T. D. *et al.* UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Science*, v. 27, n. 1, p. 14-25, 2018.

GODSCHALK, F. *et al.* Comparison of MM/GBSA calculations based on explicit and implicit solvent simulations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 15, n. 20, p. 7731-7739, 2013.

GOHLKE, H.; KLEBE, G. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 41, n. 15, p. 2644-2676, 2002.

GOLD, P. E.; McGAUGH, J. L. A single-trace, two-processes view of memory storage processes. In: DEUTSCH, D.; DEUTSCH, J. A. (eds). *Short-term memory*. Academic Press, New York, p. 355-378, 1975.

GOLDMAN-RAKIC, P. S. Circuitry of the primate prefrontal cortex and the regulation of behavior by representational memory. In: *Handbook of physiology, The nervous system, Higher functions of the brain, Sec 1, Vol V, Pt 1* (Plum F, ed), pp 373–417, 1987. Bethesda, MD: American Physiological Society.

GONG, L. J. *et al.* Pinocembrin ameliorates intermittent hypoxia-induced neuroinflammation through Bnip3-dependent mitophagy in a murine model of sleep apnea. *J Neuroinflamm* v. 17, n. 1, 2020.

GOTTI, C. *et al.* Selective nicotinic acetylcholine receptor subunit deficits identified in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies by immunoprecipitation. *Neurobiol. Dis.* v. 23, p. 481-489, 2006.

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal.Biochem.* 126: 131-138, 1982.

GRIEB, P. Intracerebroventricular streptozotocin injections as a model of Alzheimer's disease: in search of a relevant mechanism. *Mol. Neurobiol.* 53, 1741–1752, 2016.

GRIEP, L. M. O. *et al.* Colors of fruit and vegetables and 10 – year incidence of stroke. *Stroke*, v. 42, p. 3190-3195, 2011.

GUO, L.; TABRIZCHI, R. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a drug target in the pathogenesis of insulin resistance. *Pharmacology & therapeutics*, v. 111, n. 1, p. 145–173, 2006.

GUO, P. *et al.* Eriodictyol and homoeriodictyol improve memory impairment in A β 25-35-induced mice by inhibiting the NLRP3 inflammasome. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 27, n. 8, p. 2488, 2022.

GUPTA, R.; SINGH, M.; SHARMA, A. Neuroprotective effect of antioxidant on ischaemia and reperfusion induced cerebral injury. *Pharmacological Research*, v. 48, p. 209-215, 2003.

GUTIERREZ, B. A. O. *et al.* Impacto econômico da doença de Alzheimer no Brasil: é possível melhorar a assistência e reduzir custos? *Cien Saúde Coletiva*. 2014;19(11):4479-86. <https://doi.org/10.1590/1413-812320141911.03562013>.

HABER, S. N. The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *J. Chem. Neuroanat.* v. 26, p. 317-330, 2003.

HABTEMARIAM, S. The Nrf2/HO-1 axis as targets for flavanones: Neuroprotection by pinocembrin, naringenin, and eriodictyol. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2019, p. 4724920, 2019.

HADDADI, R. *et al.* Silymarin improved 6-OHDA-induced motor impairment in hemiparkinsonian rats: behavioral and molecular study. *Daru*, v.22, n.1, p.38, 2014.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. *Journal of Comparative Psychology*, v. 18, n. 3, p. 385-403, 1934.

HAMEED, A. *et al.* Eriodictyol stimulates insulin secretion through cAMP/PKA signaling pathway in mice islets. *European journal of pharmacology*, v. 820, p. 245–255, 2018.

HARDER, B. *et al.* Molecular mechanisms of Nrf2 regulation and how these influence chemical modulation for disease intervention, *Biochem. Soc. Trans.*, 43 (2015) 680-686.

HASSAN, S. S. U. *et al.* The neuroprotective effects of fisetin, a natural flavonoid in neurodegenerative diseases: Focus on the role of oxidative stress. *Front Pharmacol.* v. 10, n. 13, Out 2022.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 96, p. 67-202, 2002.

HE, P. *et al.* Eriodictyol alleviates lipopolysaccharide-triggered oxidative stress and synaptic dysfunctions in BV-2 microglial cells and mouse brain. *Journal of cellular biochemistry*, v. 120, n. 9, p. 14756–14770, 2019.

HE, Y. *et al.* Efficacy of antidepressant drugs in the treatment of depression in Alzheimer disease patients: A systematic review and network meta-analysis. *J Psychopharmacol.* 2021;35(8):901-9. doi:10.1177/02698811211030181

HELY, M. A. *et al.* The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. *Mov. Disord.*, v.23, p.837-844, 2008.

HENDERSON, V. W. Three midlife strategies to prevent cognitive impairment due to Alzheimer's disease. *Climacteric: the journal of the International Menopause Society*, v. 17 Suppl 2, n. sup2, p. 38–46, 2014.

HERNÁNDEZ-ZIMBRÓN, L. F.; RIVAS-ARANCIBIA, S. Oxidative stress caused by ozone exposure induces β -amyloid 1-42 overproduction and mitochondrial accumulation by activating the amyloidogenic pathway. *Neuroscience*, v. 304, p. 340–348, 2015.

HOPKINS, C. W. *et al.* Long-time-step molecular dynamics through hydrogen mass repartitioning. *Journal of chemical theory and computation*, v. 11, n. 4, p. 1864-1874, 2015.

HOSTETTMAN, K. *et al.* Screening for flavonoids and related compounds in sequent isolation of bioactive compounds. *Akademiai, Kiahó: Budapest* p. 35-52, 1995.

HOYER, S. Memory function and brain glucose metabolism. *Pharmacopsychiatry*, v. 36 Suppl 1, p. S62-7, 2003.

HOYER, S.; LANNERT, H. Long-term abnormalities in brain glucose/ energy metabolism after inhibition of the neuronal insulin receptor: implication of tau-protein. *J Neural Transm Suppl. [S.I.]*, v. 72, p. 195-202, 2007.

HUANG, y.; MUCKE, L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*, v. 148, n. 6, p. 1204–1222, 2015.

HUR, W.; GRAY, N. S. Small molecule modulators of antioxidant response pathway, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 15 (2011) 162-173.

IMPERATRICE, M. *et al.* Hesperidin functions as an ergogenic aid by increasing endothelial function and decreasing exercise-induced oxidative stress and inflammation, thereby contributing to improved exercise performance. *Nutrients*, v. 14, n. 14, p. 2955, 2022.

ISLAM, A. *et al.* The pharmacological and biological roles of eriodictyol. *Archives of pharmacal research*, v. 43, n. 6, p. 582–592, 2020.

IWAI, T. *et al.* Glucagon-like peptide-1 protects synaptic and learning functions from neuroinflammation in rodents: GLP-1 Prevents Inflammation-Induced Dysfunction. *Journal of neuroscience research*, v. 92, n. 4, p. 446–454, 2014.

IZQUIERDO, I. Different forms of post-training memory processing. *Behav Neural Biol*, v.51, p.171-202, 1989.

IZQUIERDO, I. *et al.* Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res*, v.103, p.1-11, 1999.

IZQUIERDO, I.; McGAUGH, J. L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav. Pharmacol.*, v. 11, p. 517-534, 2000.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. GABAA receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. *Trends. Pharmacol. Sci.*, v. 12, p. 260-265, 1991.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol. Learn. Mem.*, v. 68, p. 285-316, 1997.

IZQUIERDO, L. A. *et al.* Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell Mol Neurobiol*, v.22, p.269-287, 2002.

JAVADI, F. *et al.* The effect of quercetin on inflammatory factors and clinical symptoms in women with rheumatoid arthritis: A double-blind, randomized controlled trial. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 36, n. 1, p. 9–15, 2017.

JAY, T. M. Dopamine: a potential substrate for synaptic Plasticity and memory mechanisms. *Prog. Neurobiol.*, v.69, p.375-390. 2003.

JESSEN, K. R. Glial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 36, p. 1861-1867, 2004.

JIANG, Z. Y.; LU, M. C.; YOU, Q. D. Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2) Inhibition: An Emerging Strategy in Cancer Therapy, *J. Med. Chem.*, 62 (2019) 3840-3856.

Jing, X., Shi, H., Zhu, X., Wei, X., Ren, M., Han, M., Ren, D., Lou, H., 2015. Eriodictyol Attenuates beta-Amyloid 25-35 Peptide-Induced Oxidative Cell Death in Primary Cultured Neurons by Activation of Nrf2. *Neurochemical research* 40, 1463-1471.

JOHN, G. R.; LEE, S. C.; BROSNAN, C. F. Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist*, v. 9, n. 1, p. 10-22, Feb 2003.

JUCÁ, M. M. *et al.* Flavonoids: Biological activities and therapeutic potential. *Nat. Prod. Res.* v. 5, p. 692–705, 2020.

JUNOD, A. *et al.* Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *The journal of clinical investigation*, v. 48, n. 11, p. 2129–2139, 11 1969.

KAMAT, P. K. Streptozotocin induced Alzheimer's disease like changes and the underlying neural degeneration and regeneration mechanism. *Neural regeneration research*, v. 10, n. 7, p. 1050–1052, 2015.

KENSLER, T. W.; WAKABAYASHI, N.; BISWAL, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007, 47, 89–116.

KERR, F. *et al.* Direct Keap1-Nrf2 disruption as a potential therapeutic target for Alzheimer's disease. *PLoS genetics*, v. 13, n. 3, p. e1006593, 2017.

KHAN, M. M. *et al.* Resveratrol attenuates 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage and dopamine depletion in rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* v. 1328, p. 139-151, 2010.

KHAN, M. M. *et al.* Rutin protects the neural damage induced by transient focal ischemia in rats. *Brain Research*, v. 1292, p. 123-135, 2009.

KIM, J. M. *et al.* Antiamnesic effect of *Dendropanax morbifera* via JNK signaling pathway on cognitive dysfunction in high-fat diet-induced diabetic mice. *Behavioural Brain Research*, 2016.

KIM, K. L. *et al.* Crystal structure of GSK3beta complexed with Morin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v 504, n. 2, p. 519-5242, Oct., 2018.

KIVIPELTO M. *et al.* World-Wide FINGERS Network: A global approach to risk reduction and prevention of dementia. *Alzheimers Dement.* 2020;16(7):1078-94.
doi:10.1002/alz.12123. 46.

KLOSKE, C. M. *et al.* Impaired neuroinflammatory response of ApoE4 in Alzheimer's disease patients: Molecular and cell biology/neuroinflammation. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, v. 16, n. S2, 2020.

KNEZOVIC, A.; OSMANOVIC-BARILAR, J.; CURLIN, M.; HOF, P. R.; SIMIC, G.; RIEDERER, P, *et al.* Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *J Neural Transm*;122(4):577–92, 2015.

KODA, T.; KURODA, Y.; IMAI, H. Protective effect of rutin against spatial memory impairment induced by trimethyltin in rats. *Nutrition Research*, v. 28, p. 629-634, 2008.

KRIVÁK, R.; HOKSZA, D. P2Rank: machine learning based tool for rapid and accurate prediction of ligand binding sites from protein structure. *Journal of cheminformatics*, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2018.

KUMAR S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An Overview. *Sci. World J.* 2013. ID 162750

KWON, E.-Y.; CHOI, M.-S. Dietary eriodictyol alleviates adiposity, hepatic steatosis, insulin resistance, and inflammation in diet-induced obese mice. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 5, p. 1227, 2019.

LAGINESTRA-SILVA, A. *et al.* Prevalência de demências no Brasil: um estudo de revisão sistemática. *Revista Neurociências*, v. 29, p. 1–14, 2021.

LAGO, J. H. G. *et al.* Structure-Activity Association of Flavonoids in Lung Diseases. *Molecules*. v. 19, 2014.

LALONDE, R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 26:91–104, 2002.

LANFRAY, D.; ARTHAUD, S.; OUELLET, J.; COMPÈRE, V.; DO REGO, J. L.; LEPRINCE, J.; LEFRANC, B.; CASTEL, H. et al. Gliotransmission and brain glucose sensing: critical role of endozepines. *Diabetes* 62:801–810, 2013.

LANNERT, H.; HOYER, S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci*, v. 112, n. 5, p. 1199–208, Oct 1998. ISSN 0735-7044. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9829797>

LAWRENCE, M.; XU, Y. Structure of the ectodomain of the human Type 1 insulin-like growth factor receptor. *Worldwide Protein Data Bank*, 28 fev. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2210/pdb5u8r/pdb>

LEE, J. S.; SURH, Y. J. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett.* 2005, 224, 171–184.

LEE, J.-H. *et al.* Faulty autolysosome acidification in Alzheimer's disease mouse models induces autophagic build-up of A β in neurons, yielding senile plaques. *Nature neuroscience*, v. 25, n. 6, p. 688–701, 2022.

LELOUP, C., et al.,. Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei. *Brain Research*. 638, 221–226, 1994.

LENT, R. (ed). *Cem Bilhões de Neurônios*. Editora Atheneu, São Paulo, p. 587–618, 2001.

LENT, R. *Pessoas com História: As Bases Neurais da Memória e da Aprendizagem*. In: LENZEN, S. *The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes*. *Diabetologia*, v. 51, n. 2, p. 216–226, 2008.

LESTER-COLL, N.; RIVERA, E.; SOSCIA, S.; DOIRON, K.; WANDS, J.; DE LA MONTE, S. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers Disease*, v. 9, n. 1, p. 13–33, 2006.

LESTER-COLL, N.; RIVERA, E.; SOSCIA, S.; DOIRON, K.; WANDS, J.; DE LA MONTE, S. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers Disease*, v. 9, n. 1, p. 13–33, 2006.

LEUSSIS, M. P; BOLIVAR, V. J. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neurosci Biobehav Rev*, v.30, p.1045–1064, 2006.

LI, C.-Z. et al. Eriodictyol attenuates cisplatin-induced kidney injury by inhibiting oxidative stress and inflammation. *European journal of pharmacology*, v. 772, p. 124–130, 2016.

LI, L. *et al.* Eriodictyol ameliorates cognitive dysfunction in APP/PS1 mice by inhibiting ferroptosis via vitamin D receptor-mediated Nrf2 activation. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, v. 28, n. 1, p. 11, 2022.

LI, R. S. *et al.* Design, synthesis and evaluation of flavonoid derivatives as potential multifunctional acetylcholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* v. 23, p. 2636–2641, 2013.

LI, W. *et al.* Eriodictyol inhibits proliferation, metastasis and induces apoptosis of glioma cells via PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway. *Frontiers in pharmacology*, v. 11, p. 114, 2020.

LORENZINI, C. A. *et al.* Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Res.* v. 730, p. 32-39, 1996.

LU, J. *et al.* Chronic administration of troxerutin protects mouse brain against D-galactose-induced impairment of cholinergic system. *Neurobiology of Learning and Memory.* *Neurobiol Learn Mem*, v.93, n.2, p.157-164, 2010a.

LU, J. *et al.* Troxerutin Counteracts Domoic Acid- Induced Memory Deficits in Mice by Inhibiting CCAAT/Enhancer Binding Protein b-Mediated Inflammatory Response and Oxidative Stress. *J Immunol*, v. 190, n.7, p.3466-3479, 2013.

LU, J. *et al.* Troxerutin protects against high cholesterol-induced cognitive deficits in mice. *Brain*, v.134, p. 783–797, 2011.

LU, J. *et al.* NGF-Dependent Activation of TrkA Pathway: A Mechanism for the Neuroprotective Effect of Troxerutin in D-Galactose-Treated Mice. *Brain Pathology*, v.20, p.952-965, 2010b.

LV, F. *et al.* Eriodictyol inhibits glioblastoma migration and invasion by reversing EMT via downregulation of the P38 MAPK/GSK-3 β /ZEB1 pathway. *European journal of pharmacology*, v. 900, n. 174069, p. 174069, 2021.

LV, P. *et al.* Eriodictyol inhibits high glucose-induced oxidative stress and inflammation in retinal ganglial cells: LV et al. *Journal of cellular biochemistry*, v. 120, n. 4, p. 5644–5651, 2019.

LYRA, R. *et al.* Tratamento farmacológico da hiperglicemia no DM2. *Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes* (2022). DOI: 10.29327/557753.2022-10, ISBN: 978-65-5941-622-6.

MACHADO, A. P. R.; CARVALHO, I. O.; ROCHA SOBRINHO, H. M. DA. NEUROINFLAMAÇÃO NA DOENÇA DE ALZHEIMER. *Revista Brasileira Militar de Ciências*, v. 6, n. 14, 2020.

MAIER, J. A. et al. ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *Journal of chemical theory and computation*, v. 11, n. 8, p. 3696-3713, 2015.

MALEKI, S. J.; CRESPO, J. F.; CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chem.* v. 299, 2019. ID:125124.

MARCHETTI, B.; ABBRACCHIO, M. P. To be or not to be (inflamed) is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Pharmacol. Sci.* v. 26, p. 517-525, 2005.

MARQUES, C. L. S. *et al.* Physical therapy in patients with Alzheimer's disease: a systematic review of randomized controlled clinical trials. *Fisioter Pesqui.* 2019;26(3):311-21. doi:10.1590/1809-2950/18037226032019.

MARVINSKETCH DOWNLOADS. Disponível em: <https://docs.chemaxon.com/display/lts-europium/marvinsketch-downloads.md>. Acesso em: 21 nov. 2022.

MATTSON, M. P.; MAGNUS, T. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci* v. 7, n. 4, p. 278-294, 2006.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *The journal of biological chemistry*, v. 244, n. 22, p. 6056–6063, 1969.

MCGEER, P. L. *et al.* Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* v.38, p.1285–1291, 1988.

MCKINNEY, M.; COYLE, J. T.; HEDREEN, J. C. Topographic analysis of the innervation of the rat neocortex and hippocampus by the basal forebrain cholinergic system. *The Journal of comparative neurology*, v. 217, n. 1, p. 103–121, 1983.

MEHMOOD, T.; ANWAR, F.; TABASSAM, Q. Eriodictyol. Em: MUSHTAQ, M.; ANWAR, F. (Eds.). *A Centum of Valuable Plant Bioactives*. San Diego, CA, USA: Elsevier, 2021. p. 467–489.

MENDONÇA, A. P. F. M. Resveratrol exerce efeito neuroprotetor em animais parkinsonianos via inibição da inflamação e aumento da proteína transportadora de dopamina (DAT). 2017. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

MENG, Q.; LIN, M. S.; TZENG, I. S. Relationship between exercise and Alzheimer's disease: a narrative literature review. *Front Neurosci.* 2020;14:131. Doi:10.3389/fnins.2020.00131.

MENG, T.-C. *et al.* Regulation of insulin signaling through reversible oxidation of the protein-tyrosine phosphatases TC45 and PTP1B. *The journal of biological chemistry*, v. 279, n. 36, p. 37716–37725, 2004.

MESHIKHES, A. -W. N. Efficacy of Daflon in the treatment of hemorrhoids. *Saudi medical journal*, v. 23, n. 12, p. 1496–1498, 2002.

MEYER, C.; O'KEEFE, F. Non-pharmacological interventions for people with dementia: A review of reviews. *Dementia (London)*. 2020;19(6):1927-54. Doi:10.1177/1471301218813234

MEYER-LUEHMANN, M. *et al.* Exogenous induction of cerebral β -amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science (New York, N.Y.)*, v. 313, n. 5794, p. 1781–1784, 2006.

MILLER, B. R., 3rd *et al.* MMPBSA.Py: An efficient program for end-state free energy calculations. *Journal of chemical theory and computation*, v. 8, n. 9, p. 3314–3321, 2012.

MIYAKE, Y. *et al.* Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids*, v. 33, n. 7, p. 689–695, 1998.

MOGHBELINEJADA, S. *et al.* Rutin activates the MAPK pathway and BDNF gene expression on beta-amyloid induced neurotoxicity in rats. *Toxicology Letters*, v.224, p. 108–113, 2014.

MOKDAD-BZEOUICH, I. *et al.* Investigation of immunomodulatory and anti-inflammatory effects of eriodictyol through its cellular anti-oxidant activity. *Cell stress & chaperones*, v. 21, n. 5, p. 773–781, 2016.

MOREIRA, S. C.; JANSEN, A. K.; SILVA, F. M. Dietary interventions and cognition of Alzheimer's disease patients: a systematic review of randomized controlled trial. *Dement Neuropsychol.* 2020;14(3):258-82. Doi:10.1590/1980-57642020dn14-030008.

MOREIRA, S. V.; JUSTI, F. R.R.; MOREIRA, M. Can musical intervention improve memory in Alzheimer's patients? Evidence from a systematic review. *Dement Neuropsychol.* 2018;12(2):133-42. doi:10.1590/1980-57642018dn12-020005.

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 11: 47-60, 1984.

MOSCONI, L.; SORBI, S.; DE LEON, M. J.; LI, Y.; NACMIAS, B.; MYOUNG, P. S.; TSUI, W.; GINESTRONI, A. *et al.* Hypometabolism exceeds atrophy in presymptomatic early-onset familial Alzheimer's disease. *J Nucl Med* 47:1778–1786, 2006.

MOSCOVITCH, M. Memory and working-with-memory: A component process model based on modules and central systems. *J. Cognit. Neurosci.*, v. 4, n.3, p. 257–267, 1992.

MOU, Y. *et al.* Recent progress in Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, v. 202, n. 112532, p. 112532, 2020.

MOU, Y. *et al.* Recent progress in Keap1-Nrf2 Protein-protein Interaction Inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 112532, 2020. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112532

MUCKE, L.; MASLIAH, E.; YU, G.; MALLORY, M.; ROCKENSTEIN, E.; TATSUNO, G.; HU, K.; KHOLODENKO, D.; JOHNSON-WOOD, K.; MCCONLOGUE, L. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *Journal of Neuroscience*, v. 20, n. 11, p. 4050–4058, 2000.

MYTHRI, R. B., BHARATH, S. Curcumin: A Potential Neuroprotective Agent in Parkinson's Disease. *Current Pharmaceutical Design*, v 18, p. 91-99, 2012.

NAQVI, A. A. T. *et al.* Advancements in docking and molecular dynamics simulations towards ligand-receptor interactions and structure-function relationships. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 18, n. 20, p. 1755–1768, 2018.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). PubChem Compound Summary for CID 440735, Eriodictyol. PubChem, 2022. Disponível em:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eriodictiol>. Acessado em: 23 de novembro de 2022.

NICOLETTI, G. M. DOS S.; SOUZA, G. S. D. E. Perfil epidemiológico dos números de casos de alzheimer: caracterização do processo evolutivo e fatores de risco / Epidemiological profile of cases of alzheimer's disease characterization of the evolutionary process and risk factors. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 4, n. 2, p. 8185–8197, 2021.

NIMMRICH, V.; EBERT, U. Is Alzheimer's disease a result of presynaptic failure? Synaptic dysfunctions induced by oligomeric beta-amyloid. *Reviews in the neurosciences*, v. 20, n. 1, p. 1–12, 2009.

NITURE, S. K.; KHATRI, R.; JAISWAL, A. K. Regulation of Nrf2-an update, *Free Radic. Biol. Med.*, 66 (2014) 36-44.

NONES, J.; SPOHR, T. C. L. S.; GOMES, F. C. A. Hesperidin, a flavone glycoside, as mediator of neuronal survival. *Neurochem Res*, v. 36, p. 1776-1784, 2011.

O'BRYANT, S. E. *et al.* Characterization of mild cognitive impairment and dementia among community-dwelling Mexican Americans and non-Hispanic whites. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, v. 90, n. 2, p. 905–915, 2022.

ODDO, S.; CACCAMO, A.; SHEPHERD, J.; MURPHY, M.; GOLDE, T.; KAYED, R.; METHERATE, R.; MATTSON, M.; AKBARI, Y.; LAFERLA, F. Triple-transgenic model of alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*, v. 39, n. 3, p. 409–421, 2003.

OH, Y. S.; JUN, H.-S. Effects of glucagon-like peptide-1 on oxidative stress and Nrf2 signaling. *International journal of molecular sciences*, v. 19, n. 1, 2017.

OHTO, U.; SHIMIZU, T. Crystal structure of mouse TLR4/MD-2/LPS complex. *Worldwide Protein Data Bank*, 9 maio 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2210/pdb3vq2/pdb>

OUTKA, D. A. *et al.* ChemInform abstract: ADSORPTION AND HYDROGENATION OF ACETYLENE ON COPPER CU(110) AND CU(110)-O SURFACES. *Chemischer Informationsdienst*, v. 14, n. 36, 1983.

PACKARD, M. G.; KNOWLTON, B. J. Learning and memory functions of the basal ganglia. *Annu. Rev. Neurosci.* v. 25, p. 563-593, 2002.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* v. 5, n. 47, Dec 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5465813/>
PANTSAR, T.; POSO, A. Binding affinity via docking: fact and fiction. *Molecules*, v. 23, n. 8, p. 1899, 2018.

PAPAKYRIAKOPOULOU, P. *et al.* Potential pharmaceutical applications of quercetin in cardiovascular diseases. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, v. 15, n. 8, p. 1019, 2022.
PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Gulf Professional Publishing, 2004.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6. ed. Elsevier, 2006.
PETERS, J. H.; DE GROOT, B. L. Ubiquitin dynamics in complexes reveal molecular recognition mechanisms beyond induced fit and conformational selection. 2012.

PIPATPIBOON, N. *et al.* DPP4-inhibitor improves neuronal insulin receptor function, brain mitochondrial function and cognitive function in rats with insulin resistance induced by high-fat diet consumption. *The European journal of neuroscience*, v. 37, n. 5, p. 839–849, 2013.

PIPATPIBOON, N. *et al.* PPAR γ agonist improves neuronal insulin receptor function in hippocampus and brain mitochondria function in rats with insulin resistance induced by long term high-fat diets. *Endocrinology*, v. 153, n. 1, p. 329–338, 2012.

POLIDORI, J. W. *THE DIARY*. Em: ROSSETTI, W. M. (Ed.). *The Diary of Dr John William Polidori, 1816*. Cambridge: Cambridge University Press, 2014. p. 25–222.

PREDIGER, R. D. S.; FERNANDES, D.; TAKAHASHI, R. N. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. *Behavioural brain research*, v. 159, n. 2, p. 197–205, 2005.

PROADI. Disponível em: <http://hospitais.proadi-sus.org.br/projeto/relatorio-nacional-sobre-a-demencia-no-brasil-renade-cuidado-custos-e-investimento1>. Acesso em: 24 nov. 2022.

PyMOL. Disponível em: <https://pymol.org/2/>. Acesso em: 21 nov. 2022.

PYRZANOWSKA, J. *et al.* Influence of long-term administration of rutin on spatial memory as well as the concentration of brain neurotransmitter sinage drats. *Pharmacol. Rep*, v.64, p.808-816, 2012.

QUEIROZ, J. de S. B. *Modelo de demência de Alzheimer Esporádica induzida por injeção intracerebroventricular de estreptozotocina: Avaliação da memória em camundongos*. 2016. 48 f. Monografia (Graduação em Ciências biológicas)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

RAJAN, V. K.; MURALEEDHARAN, K.; HUSSAN, K. P. S. Structural evaluation and toxicological study of a bitter masking bioactive flavanone, ‘eriodictyol’.

RAMASSAMY, C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *European Journal of Pharmacology*, v. 545, p. 51-64, 2006.

RANSOHOFF, R. M; PERRY, V. H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual Review of Immunology*, v.27, p. 119-145, 2009.

RAVELLI, K. G. *et al.* Intracerebroventricular streptozotocin as a model of Alzheimer’s disease: Neurochemical and behavioral characterization in mice. *Neurotoxicity research*, v. 31, n. 3, p. 327–333, 2017.

RAVI, S. K.; NARASINGAPPA, R. B.; VINCENT, B. Neuro- Nutrients as Anti-Alzheimer's Disease Agents: A Critical Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2018. DOI: 10.1080/10408398.2018.1481012

RAVULA, A. R. *et al.* Fisetin, potential flavonoid with multifarious targets for treating neurological disorders: An updated review. *Eur J Pharmacol.* 2021 Nov 5;910:174492. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174492. Epub 2021 Sep 10. PMID: 34516952.

REDDY, S. P. The antioxidant response element and oxidative stress modifiers in airway diseases. *Curr. Mol. Med.* 2008,8, 376–383.

REDER, L. M.; DONAVOS, D. K.; ERICKSON, M. A. Perceptual match effects in direct tests of memory: the role of contextual fan. *Memory & cognition*, v. 30, n. 2, p. 312–323, 2002.

REMACLE, J. *et al.* Importance of various antioxidant enzymes for cell stability. Confrontation between theoretical and experimental data. *The Biochemical journal*, v. 286, n. 1, p. 41–46, 1992.

REN, Q. *et al.* Flavonoid fisetin alleviates kidney inflammation and apoptosis via inhibiting Src-mediated NF- κ B p65 and MAPK signaling pathways in septic AKI mice. *Biomed Pharmacother.* v. 122, Feb 2020.

REN, R. *et al.* Neuroprotective Effects of A Standardized Flavonoid Extract of Safflower Against Neurotoxin-Induced Cellular and Animal Models of Parkinson's Disease. *Sci Rep*, v. 6, 2016.

RIBEIRO, H. F.; DOS SANTOS, J. S. F.; DE SOUZA, J. N. Doença de Alzheimer de início precoce (DAIP): características neuropatológicas e variantes genéticas associadas. *Revista de neuro-psiquiatria*, v. 84, n. 2, p. 113–127, 2021.

ROSSATO, J. I. *et al.* A link between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain. *An. Acad. Bras. Cienc.* v. 78, n. 3, p. 515-523, 2006.

RUBENSTEIN, A. B. *et al.* Systematic comparison of Amber and Rosetta energy functions for protein structure evaluation. *Journal of chemical theory and computation*, v. 14, n. 11, p. 6015–6025, 2018.

RYCKAERT, J.; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of computational physics*, v. 23, n. 3, p. 327-341, 1977.

SAJID, M. *et al.* Synthetic biology towards improved flavonoid pharmacokinetics. *Biomolecules*, v. 11, n. 5, p. 754, 2021.

SALEH, H. A.-R. *et al.* Plant growth, yield and bioactive compounds of two culinary herbs as affected by substrate type. *Sci. Hortic.* V. 243, p. 464–471, 2019.

SALKOVIC-PETRISIC, M. *et al.* Alzheimer- like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. *J Neurochem*, [S.I.], v. 96, p. 1005-15, 2006.

SALKOVIC-PETRISIC, M.; HOYER, S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *J Neural Transm Suppl*, [S.I.], v.72, p. 217-233, 2007.

SALKOVIC-PETRISIC, M.; TRIBL, F.; SCHMIDT, M.; HOYER, S.; RIEDERER, P. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. *J Neurochem* 96, 1005-15, 2006.

SAMEC, D. *et al.* The role of polyphenols in abiotic stress response: The influence of molecular structure. *Plants*. v.10, n.118, 2021.

SAMPATH, S.; KARUNDEVI, B. Effect of troxerutin on insulin signaling molecules in the gastrocnemius muscle of high fat and sucrose-induced type-2 diabetic adult male rat. *Mol Cell Biochem*, v. 395, p.11-27, 2014.

SANTANGELO, C. *et al.* Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann. Ist. Super Sanita*. v. 43, p. 394-405, 2007.

SANTOS, F. *et al.* Blood biomarkers for the diagnosis of neurodegenerative dementia: A systematic review. *Journal of geriatric psychiatry and neurology*, p. 8919887221141651, 2022.

SARACENO, C.; MUSARDO, S.; MARCELLO, E.; PELUCCHI, S.; & DI LUCA, M. Modeling Alzheimer's disease: From past to future. *Frontiers in Pharmacology*, 4 JUN(June), 1-22, 2013. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00077>

SARTER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D. N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. *Psychopharmacology* 94: 491-495, 1988.

SAXENA, G.; PATRO, I, K.; NATH, C. ICV STZ induced impairment in memory and neuronal mitochondrial function: a protective role of nicotinic receptor. *Behav Brain Res*. 224:50-57, 2011.

SCHALLERT, T.; WOODLEE, M. T.; FLEMING, S. M. Disentangling multiple types of recovery from brain injury. In: Krieglstein, J., Klumpp, S. (Eds.), *Pharmacology of Cerebral Ischemia*. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 2002.

SCHEFF, S.; PRICE, D.; SCHMITT, F.; MUFSON, E. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*, v. 27, n. 10, p. 1372-1384, 2006.

SCHIPPER, H. M. Presymptomatic apolipoprotein E genotyping for Alzheimer's disease risk assessment and prevention. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, v. 7, n. 4, p. e118-23, 2011.

SEDLAK J., LINDSAY R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.*, v. 25, p. 192-195, 1968.

SERAFINI, M.; PELUSO, I.; RAGUZZINI, A. Flavonoids as Anti-Inflammatory Agents. *Proc. Nutr. Soc.* v. 69, p. 273–278, 2010.

SHAH, K.; DESILVA, S.; ABBRUSCATO, T. The role of glucose transporters in brain disease: diabetes and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*, v. 13, n. 10, p. 12629-55, Oct 03 2012.

SHAHIDI, S. *et al.* The effect of chronic stimulation of serotonin receptor type 7 on recognition, passive avoidance memory, hippocampal long-term potentiation, and neuronal apoptosis in the amyloid β protein treated rat. *Psychopharmacology* 235, 1513–1525 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00213-018-4862-3>

SHAMSUDIN, N. F. *et al.* Flavonoids as Antidiabetic and Anti-Inflammatory Agents: A Review on Structural Activity Relationship-Based Studies and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci*. v. 23, n. 20, Oct. 2022.

SHARMA, M.; GUPTA, Y. K. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. *Life Sci*, v. 68, n. 9, p. 1021-9, Jan 19 2001. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205.

SHAVANDI, M. *et al.* Silymarin (Livergol®) decreases disease activity score in patients with rheumatoid arthritis: A non-randomized single-arm clinical trial. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology*, v. 16, n. 2, p. 99–106, 2017.

SHEN, N. *et al.* Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chem*, Jul 2022.

SHKURTI, A. *et al.* pyPcazip: A PCA-based toolkit for compression and analysis of molecular simulation data. *SoftwareX*, v. 5, p. 44-50, 2016.

SHULMAN, R. G. *et al.* Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. *Trends Neurosci*, v. 27, n. 8, p. 489-95, Aug 2004.

SIHVOLA, V.; LEVONEN, A.-L. Keap1 as the redox sensor of the antioxidant response, *Arch. Biochem. Biophys.*, 617 (2017) 94-100.

SILVA, A. T. A. Fisetina, um flavonóide que protege camundongos do dano neuronal e déficit de memória induzido por isquemia cerebral focal permanente. 2016. 95 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

SMALL, G.; BULLOCK, R. Defining optimal treatment with cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011;7(2):177-84. doi:10.1016/j.jalz.2010.03.016.

SMALLFIELD, S.; HECKENLAIBLE, C. Effectiveness of occupational therapy interventions to enhance occupational performance for adults with Alzheimer's Disease and related major neurocognitive disorders: a systematic review. *Am J Occup Ther*. 2017;71(5):7105180010p1-p9. Doi:10.5014/ajot.2017.024752.

SMID, J. *et al.* Declínio cognitivo subjetivo, comprometimento cognitivo leve e demência - diagnóstico síndrome: recomendações do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. *Dementia & neuropsychologia*, v. 16, n. 3 suppl 1, p. 1–24, 2022.

SOLFRIZZI, V. *et al.* Relationships of dietary patterns, foods, and micro- and macronutrients with Alzheimer's disease and late-life cognitive disorders: A systematic review. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, v. 59, n. 3, p. 815–849, 2017.

SONKUSARE, S. *et al.* Effect of donepezil and lercanidipine on memory impairment induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Life sciences*, v. 77, n. 1, p. 1–14, 2005.

SPENCER, J. P. E. The interactions of flavonoids within neuronal signalling pathways. *Genes and Nutrition*, v. 2, p. 257-273, 2007.

SPENCER, J. P. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *British Journal of Nutrition*, v. 104, 2010.

SPELLANTINI, M. G. *et al.* α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature*. v.388, p.839–840, 1997.

SQUIRE, L. R.; ZOLA, S. M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 26, n. 93, p. 13515-22, 1996.

STEEN, E. *et al.* Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis*, v. 7, n. 1, p. 63-80, Feb 2005.

STONER, C. R. *et al.* Psychosocial interventions for dementia in low- and middle-income countries (LMICs): a systematic review of effectiveness and implementation readiness. *Aging Ment Health*. 2021;25(3):408-19. doi:10.1080/13607863.2019.1695742.

STRAWBERRIES may help fend off Alzheimer's. Disponível em: <https://www.rush.edu/news/strawberries-may-help-fend-alzheimers>. Acesso em: 30 nov. 2022.

STURCHIO, A. *et al.* High soluble amyloid- β 42 predicts normal cognition in amyloid-positive individuals with Alzheimer's disease-causing mutations. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, v. 90, n. 1, p. 333-348, 2022.

SUZUKI, M. *et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of vitamin D supplementation in Parkinson disease. *Am J Clin Nutr*, 97(5): 1004-13, 2013.

SUZUKI, T.; YAMAMOTO, M. Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system, *Free Radic. Biol. Med.*, 88, Part B (2015) 93-100.

SWAROWSKY, A.; RODRIGUES, L.; BIASIBETTI, R.; LEITE, M. C.; DE OLIVEIRA, L. F.; DE ALMEIDA, L. M. *et al.*, Glial alterations in the hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of the nucleus basalis magno cellularis. *Behavioural Brain Research*, 190:206–1, 2008.

TABAK, A. G. *et al.* Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *Lancet* 379, 2279 e 2290, 2012.

TADAIESKY, M. T. *et al.* Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, v. 156, n. 4, p.830-840, 2008.

TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation*, v.107, p. 7-11, 2001.

TANGNEY, C. C. *et al.* Relation of DASH- and Mediterranean-like dietary patterns to cognitive decline in older persons. *Neurology*, v. 83, n. 16, p. 1410–1416, 2014.

TANSEY, M. G.; GOLDBERG, M. S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol. Dis.*, v. 37, n. 3, p. 510-518, 2010.

TEIXEIRA, M. D. A. *et al.* Catechin attenuates behavioral neurotoxicity induced by 6-OHDA in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v.110, p. 1-7, 2013.

TERAHARA, N. Flavonoids in foods: A Review. *Nat. Prod. Com.* v. 10, p. 521–528, 2015.

THOMAS G. D. *et al.* Monoacidic Inhibitors of the Kelch-like ECH-Associated Protein 1: Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (KEAP1:NRF2) Protein–Protein Interaction with High Cell Potency Identified by Fragment-Based Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 59, n. 8, 3991-4006, 2016.

THORENS, B. Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion. *Diabetes Obes Metab* 13(Suppl 1): 82–88, 2011.

THRELFELL, S. *et al.* Striatal dopamine release is triggered by synchronized activity in cholinergic interneurons. *Neuron*, v.75, p.58-64, 2012.

TOUPS, K. *et al.* Precision medicine approach to Alzheimer's disease: Successful pilot project. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, v. 88, n. 4, p. 1411–1421, 2022.

TUFEKCI, K. U. *et al.* Chapter Four – Inflammation in Parkinson's Disease. *Inflammation in Neuropsychiatric Disorders*, v.88, p.69-132, 2012.

UDDIN, S. *et al.* Molecular Insight into the Therapeutic Promise of Flavonoids against Alzheimer's Disease. *Molecules*. v. 25, 2020.

ULLAH, A. *et al.* Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules*. v. 25, n. 5243, 2020.

VAN DER HEIDE, L. P.; RAMAKERS, G. M.; SMIDT, M. P. Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Prog Neurobiol.* v. 79, p. 205-226, 2006.

VERLI, Hugo. *Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular*. 2014.

- VICENTE, E. et al. Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Res*, v. 1251, p. 204-12, Jan 28 2009.
- VILLEMAGNE, V. L. et al. Abeta-amyloid and Tau Imaging in Dementia. *Semin Nucl Med*, v. 47, n. 1, p. 75-88, Jan 2017.
- VOLKAMER, A. et al. DoGSiteScorer: a web server for automatic binding site prediction, analysis and druggability assessment. *Bioinformatics*, v. 28, n. 15, p. 2074-2075, 2012.
- WAKU, T. et al. Cys285Ser mutant PPARgamma ligand-binding domain complexed with 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2. *Worldwide Protein Data Bank*, 6 out. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2210/pdb2zvt/pdb>
- WANG, C. et al. Eriodictyol attenuates MCAO-induced brain injury and neurological deficits via reversing the autophagy dysfunction. *Frontiers in systems neuroscience*, v. 15, p. 655125, 2021.
- WANG, J. et al. Case. Development and testing of a general Amber force field. *J. Comput. Chem.*, 2004, 25, 1157–1174.
- WANG, S. et al. Tanshinone I selectively suppresses pro-inflammatory genes expression in activated microglia and prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Journal of Ethnopharmacology*, v.164, n. 22, p. 247–255, 2015b.
- WANG, Y. Q. et al. Neuroprotective effects of ginkgetin against neuroinjury in Parkinson's disease model induced by MPTP via chelating iron. *Free Radical Research*, v. 49, n. 9, p. 1069-1080, 2015a.
- WATSON, G. S.; CRAFT, S. The role of insulin resistance in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for treatment. *CNS Drugs* 17, 27 e 45, 2003.
- WATSON, R.; PREEDY, V.; ZIBADI, S. (Eds.). *Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease*. San Diego, CA, USA: Elsevier, 2018. p. 45–60.
- WHITE, N. M.; MCDONALD, R. J. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem*, v. 77, n. 2, p. 125-184, 2002.
- WILKEN, M. R. et al. Effects of anthocyanin-rich berries on the risk of metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis. *The review of diabetic studies: RDS*, v. 18, n. 1, p. 42–57, 2022.
- WILLETTE, A. A.; XU, G.; JOHNSON, S. C.; BIRDSILL, A. C.; JONAITIS, E. M. Insulin resistance, brain atrophy and cognitive performance in late middle-aged adults. *Diabetes Care* 36:443–449, 2013.
- WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radic. Biol. Med.* v. 52, p. 35-45, 2012.

WU, J. *et al.* Rutin attenuates Neuroinflammation in Spinal Cord Injury Rats, *Journal of Surgical Research*, 2016.

XIA, Y. *et al.* RelB regulation of chemokine expression modulates local inflammation. *American Journal of Pathology*, v. 151, n. 2, p. 375-387, 1997.

XIAO, W. Advances in NF- κ B signaling transduction and transcription. *Cellular & Molecular Immunology* v.1, p.425-433, 2004.

XIE, G. *et al.* Eriodictyol attenuates arsenic trioxide-induced liver injury by activation of Nrf2. *Oncotarget*, v. 8, n. 40, p. 68668–68674, 2017.

XU, H. *et al.* Long-term effects of cholinesterase inhibitors on cognitive decline and mortality. *Neurology*. 2021;96(e):2220-30. doi:10.1212/ WNL.0000000000011832.

XUA, P. X. *et al.* Rutin improves spatial memory in Alzheimer's disease transgenic mice by reducing A β oligomer level and attenuating oxidative stress and neuroinflammation. *Behavioural Brain Research*, v. 264, p. 173-180, 2014.

YAO, L. *et al.* Eriocitrin: A review of pharmacological effects. *Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy]*, v. 154, n. 113563, p. 113563, 2022.

YORK HEALTH ECONOMICS CONSORTIUM. NICE: Overview of Systematic Reviews of Non-pharmacological Interventions for Dementia [Internet]. Final Report. Heslington: University of York; 2017 [citado em 22 ago 2022]. Disponível em: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng97/evidence/appendix-o-yhec-report-pdf-174697045530>

YORK, D. M. *et al.* Molecular modeling studies suggest that zinc ions inhibit HIV-1 protease by binding at catalytic aspartates. *Environmental health perspectives*, v. 101, n. 3, p. 246–250, 1993.

YOUDIM, K. A. *et al.* Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Biol Chem*, v. 19, p. 383-503, 2002.

YOUDIM, K. A. *et al.* Interaction between flavonoids and the blood–brain barrier: in vitro studies. *J.Neurochem*, v. 85, p. 180-192, 2003.

YUAN, Z. *et al.* Eriocitrin alleviates sevoflurane-induced cytotoxicity in HT22 cells via Nrf2 pathway. *Tropical journal of pharmaceutical research: TJPR*, v. 22, n. 2, p. 259–264, 2022.

ZALLI, M.; FARAH, H. O.; ANTUNES, M. D. Aspectos epidemiológicos e gastos em saúde por demências no Brasil. *Revista De Medicina*, 99(6), 563-567, 2020. <https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v99i6p563-567>

ZHANG, D. *et al.* Astrogliosis in CNS pathologies: is there a role for microglia? *Mol. Neurobiol.* v. 41, n. 2-3, p. 232-241, 2010.

ZHANG, L.; LIU, C.; YUAN, M. Eriodictyol produces antidepressant-like effects and ameliorates cognitive impairments induced by chronic stress. *Neuroreport*, v. 31, n. 15, p. 1111–1120, 2020.

ZHANG, W.; WANG, G. M.; WANG, P. J.; ZHANG, Q.; SHA, S. H. Effects of neural stem cells on synaptic proteins and memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*, v. 92, n. 2, p. 185-94, Feb 2014.

ZHANG, Z. *et al.* Troxerutin Protects the Mouse Liver against Oxidative Stress-Mediated Injury Induced by d-Galactose. *J. Agric. Food Chem*, v.57, n.17, p. 7731–7736, 2009.

ZHENG, L. *et al.* Intracellular localization of amyloid-beta peptide in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Alzheimers Dis*, v. 37, p. 713-733, 2013.

ZHU, G.-F. *et al.* Eriodictyol, a plant flavonoid, attenuates LPS-induced acute lung injury through its antioxidative and anti-inflammatory activity. *Experimental and therapeutic medicine*, v. 10, n. 6, p. 2259–2266, 2015.

ZHU, J. T. T. *et al.* Flavonoids possess neuroprotective effects on cultured pheochromocytoma PC12 cells: A comparison of different flavonoids in β -amyloid-induced cell activating estrogenic effect and in preventing death. *J. Agric. Food Chem.*, v. 55, p. 2438-45, 2007. P.R. Vade-mécum Brasil. 2006/2007.