

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Avaliação das propriedades fármaco-similar e do efeito neuroprotetor de
derivados chalconoides em modelos celulares *in vitro***

THAÍS CARINE RUARO

PORTO ALEGRE, 2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Avaliação das propriedades fármaco-similar e do efeito neuroprotetor de derivados chalconoides em modelos celulares *in vitro*

Dissertação apresentada por **Thaís Carine Ruaro** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Aline Rigon Zimmer

PORTO ALEGRE, 2019

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26 de março de 2019, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Francieli Moro Stefanello
Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Dr. Débora Guerini de Souza
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Profa. Dra. Grace Gosmann
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

Ruaro, Thais Carine
Avaliação das propriedades fármaco-similar e do efeito neuroprotetor de derivados chalconoides em modelos celulares in vitro / Thais Carine Ruaro. -- 2019.

149 f.

Orientadora: Aline Rigon Zimmer.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Doença de Alzheimer. 2. Chalcona. 3. Triagem de novas moléculas in silico e in vitro. I. Zimmer, Aline Rigon, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica (LaFiS 105) e no Laboratório de 704 (LAPS) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul na cidade de Porto Alegre, com financiamento da FAPERGS, CAPES e CNPq. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.

Aos meus pais, Silvio e Marinês, por serem guerreiros incríveis e servirem de exemplo para eu continuar seguindo em frente em momentos difíceis.

Ao meu companheiro, Péricles, pela compreensão e amor cedido em todas as ocasiões.

“I have no special talents. I am only passionately curious.”

- Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A vida é esse emaranhado que eu tanto falei, às vezes com alguns nós, às vezes com nós disfarçados de laços e às vezes belos topes, “crie laços com as pessoas que lhe fazem bem, que lhe parecem verdadeiras. Desfaça os nós que lhe prendem a aquelas que foram significativas na sua vida, mas, infelizmente, por vontade própria, deixaram de ser. Nó aperta, laço enfeita”.

A vida é mesmo todo esse emaranhado, se mapearmos todos os lugares que já visitamos, onde as pessoas que amamos vivem, onde você vive, os lugares que já visitamos e traçarmos uma linha cronológica indo e vindo, a vida se torna realmente um lindo emaranhado e cada nó, as dificuldades, mágoas e decepções durante o caminho. Cada nó, um amadurecimento diferente.

Com a maturidade aprendemos a evitar a formação de novos nós, mas não a extingui-los. Aprendemos a nos respeitar como pessoa e a entender o tempo da mente. Qual seria o remédio para evitar tudo o que ainda não podemos controlar?

Eu devo agradecer a todos que de alguma forma e em algum momento me ajudaram desfazer alguns nós, aos meus pais que eu tanto amo e que sempre lutaram para que eu nunca parasse de estudar, a quem tomou um mate comigo, a quem me aconselhou mesmo por mensagem, a quem me deu um abraço apertado, a quem me fez transbordar para não explodir, a quem me fez rir, devo agradecer a vida por todas as experiências que tive até aqui e por tudo o que aprendi, porque uma coisa que eu mesma falo: "o mestrado é muito fácil, o difícil disso tudo são as transformações que acontecem conosco durante esse período", a vida nunca foi sobre a linha de chegada, mas sim sobre a jornada. Aos que me desejam o bem, obrigado por toda força.

Já dediquei essa dissertação para os que mais importam, mas devo agradecer novamente uma pessoa, Péricles, meu companheiro, meu namorado, obrigado por dividir a vida comigo, obrigado por ser feliz comigo, por tornar tudo mais fácil, mais prazeroso, obrigado por ser base, proteção e apoio. Sem você eu chegaria aonde eu quisesse, mas escolher chegar aonde eu quero com você do meu lado é muito mais incrível.

Quero agradecer em especial mais uma pessoa, minha orientadora, Aline, por acreditar em mim, por ser como você é - inteiramente incrível - eu te admiro muito,

mesmo! Obrigada pela confiança no meu trabalho, pelo respeito, pelos ensinamentos, pela compreensão e pelos conselhos.

Gostaria de deixar meu último pensamento: Não se esqueça de dizer para a pessoa do teu lado que você a ama, mas olha nos olhos e dê um abraço apertado, diz para os teus pais que eles são tua maior inspiração, aos teus filhos como eles mais te ensinam do que aprendem com você, aos teus amigos como eles fazem os momentos difíceis mais leves, não esqueça, não deixe esse Alzheimer social do cotidiano te fazer esquecer, vai lá agradece por mais um dia, faz uma pausa, toma uns mates e continua. Quando você viu, já passou, já acabou, já se foi e você já esqueceu.

Nesse emaranhado da vida somos *multi-target* em busca de uma solução.

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença progressiva crônica neurodegenerativa, que atinge principalmente idosos acima dos 80 anos. Embora a doença seja multifatorial e heterogênea, ela possui certas características fisiopatológicas que desempenham papéis imperativos na patogênese da DA, como: placas senis formadas por agregados do peptídeo β -amiloide ($A\beta$), deposição de emaranhados neurofibrilares (hiperfosforilação da proteína *Tau*), deficiência de acetilcolina (ACh), excitotoxicidade glutamatérgica, neuroinflamação e estresse oxidativo. A DA apesar de ser o tipo mais comum de demência ainda não possui cura, sendo que os fármacos atualmente disponíveis no mercado oferecem apenas alívio sintomático sendo ineficazes na prevenção da progressão da DA. O último medicamento aprovado para tratamento dos sintomas ocorreu há 16 anos. Assim, existe uma necessidade urgente de desenvolver novos compostos capazes de tratar essa patologia. As chalconas são compostos fenólicos, derivados de flavonoides, que já mostraram alguns efeitos benéficos sobre o SNC, porém estudos na literatura que relacionem os seus efeitos neuroprotetores são ainda bastante escassos. Desta forma, nesse trabalho, desenvolvemos no capítulo I uma revisão sobre a DA com enfoque nos principais avanços na busca por novos tratamentos, além disso, no capítulo II apresentamos uma série de derivados de chalconas, as quais passaram por uma avaliação inicial *in silico* para predição das propriedades ADME-TOX e em seguida por uma triagem de citotoxicidade *in vitro* e uma avaliação da ação neuroproteção frente a diferentes insultos (glutamato e peróxido de hidrogênio). Inicialmente 30 chalconoides inéditos iniciaram os estudos de triagem e apenas três derivados, chegaram nas etapas finais demonstrando baixa toxicidade *in silico* e *in vitro*, predição de ótima biodisponibilidade oral, alta capacidade de permeação através da barreira hematoencefálica e potencial atividade protetora frente a ambos insultos testados.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, Derivados chalconoides, glutamato, estresse oxidativo, neuroproteção.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a chronic progressive neurodegenerative disease, which strikes mostly seniors over 80 years. Although the disease is multifactorial and heterogeneous, it has certain pathophysiological characteristics that play imperative roles in the pathogenesis of AD, such as: senile plaques formed by aggregates of β -amyloid peptide ($A\beta$), deposition of neurofibrillary tangles (Tau protein hyperphosphorylation), deficiency acetylcholine (ACh), glutamatergic excitotoxicity, neuroinflammation and oxidative stress. AD although it is the most common type of dementia still has no cure, and the drugs currently available on the market offer only symptomatic relief and are ineffective in preventing the progression of AD. The last drug approved for treatment of symptoms occurred 16 years ago. Thus, there is an urgent need to develop new compounds capable of treating this pathology. Chalcones are phenolic compounds, derived from flavonoids, which have already shown some beneficial effects on the CNS, but studies in the literature that relate their neuroprotective effects are still very scarce. Thus, in this work, we developed in chapter I a review on AD with a focus on the main advances in the search for new treatments, in addition, in chapter II we present a series of chalcone derivatives, which underwent an initial *in silico* evaluation for prediction of the ADME-TOX properties and then by an *in vitro* cytotoxicity screening and an evaluation of the neuroprotection action against different insults (glutamate and hydrogen peroxide). Initially 30 unpublished chalcone derivatives initiated the screening studies and only three derivatives arrived in the final stages demonstrating low *in silico* and *in vitro* toxicity, prediction of optimal oral bioavailability, high permeability through the barrier hematoencephalic and potential protective activity against both insults tested.

Keywords: Alzheimer's Disease, chalcone derivatives, glutamate, oxidative stress, neuroprotection.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

FIGURA 1: Mudanças percentuais em causas de morte entre os anos de 2000 e 2015. Fonte: ALZHEIMER, 2018.....	34
FIGURA 2: Apresentação ilustrativa da patologia amiloide: a proteína precursora amiloide (APP) é clivada pela β -secretase e γ -secretase (proteases transmembranares), produzindo um monómero A β . A agregação de monômero produz oligômeros de A β tóxicos, que agregam ainda mais como placas A β insolúveis. Placas amiloides são agregados maduros A β com uma conformação de folha plissada em β . Fonte: ZIMMER, <i>et al.</i> 2014.....	37
FIGURA 3: Formação de emaranhados neurofibrilares (NFT): A hiperfosforilação das proteínas <i>Tau</i> induz uma instabilidade massiva dos microtubos da proteína tau, gerando filamentos helicoidais emparelhados. A agregação de Tau hiperfosforilada produz uma conformação filamentosa, denominada NFTs. Fonte: ZIMMER, <i>et al.</i> 2014.....	39
FIGURA 4: Modelo hipotético dinâmico de biomarcadores da cascata patológica da DA. Fonte: SPERLING, <i>et al.</i> , 2011.	48
FIGURA 5: Biomarcadores cronobiológicos de acordo com o estágio clínico da doença de Alzheimer. Fonte: LECLERC; ABULROB, 2013.	50
FIGURA 6: Abordagem de imunoterapia para a depuração de beta-amiloide. A β , proteína beta-amiloide; BBB, barreira hematoencefálica; SNC, sistema nervoso central; mAb, anticorpo monoclonal. Fonte: WINBLAD, B., <i>et al.</i> , 2014.....	57
FIGURA 7: Estrutura básica dos flavonoides.	61
FIGURA 8: Estrutura básica das chalconas.	62
FIGURA 9: Estrutura química de um novo chalcondiol, 3- (2,3-di-hidroxifenil) -1-fenilpropan-1-ona. Fonte: AL RAHIM, M., <i>et al.</i> , 2008.....	63
FIGURA 10: Chalcona sintetizada. Fonte: KWAK, J., <i>et al.</i> 2012.....	63
FIGURA 11: Chalcona tri-hidroxilada. Fonte: CONG, L., <i>et al.</i> , 2019.....	64
FIGURA 12: Estruturas dos chalconoides ativos. Fonte: ELMANN, A., <i>et al.</i> , 2013..	65

FIGURA 13: Linhagem de SH-SY5Y não diferenciada. Aumento 20x.	117
FIGURA 14: Diferenciação da SH-SY5Y e formação de uma rede de neuritos interligando as células. Aumento 40x.....	118
FIGURA 15: Citotoxicidade do glutamato na linhagem celular SH-SY5Y não diferenciada por 24h.....	118
FIGURA 16: Curva de citotoxicidade do glutamato na linhagem celular SH-SY5Y diferenciada (dif) e não diferenciada (nd) por 48h.....	119
FIGURA 17: Curva de citotoxicidade do H ₂ O ₂ na linhagem celular SH-SY5Y diferenciada (dif) e não diferenciada (nd), por 48h.....	119

CAPITULO II

FIGURA 1: Representação através do gráfico <i>Egg Boild</i> , dos chalconoides, frente a sua capacidade de biodisponibilidade oral (área branca), capacidade de permeabilidade através a barreira hematoencefálica (BHE) (área amarela) e sua interação com a P-gp (círculos azuis e vermelhos).....	93
FIGURA 2: Gráfico representativo da curva de crescimento celular das células da linhagem astrogliar C6 em diferentes densidades celulares e por um período de 24, 48 e 72 horas.	101
FIGURA 3: Insulto H ₂ O ₂ testado por um período de 24h na linhagem astrogliar C6.	102
FIGURA 4: Insulto glutamato testado por um período de 24h na linhagem astrogliar C6.....	102
TABELA 6: Viabilidade celular dos chalconoides em linhagens célularess renais sadias (VERO) e astrogliar (C6) pelos métodos de MTT e SRB.	103
FIGURA 5: Chalconoides que não exibiram proteção frente aos insultos testados (H ₂ O ₂ e glutamato).	105
FIGURA 6: Moléculas que apresentaram efeito protetor frente ao insulto de glutamato ou H ₂ O ₂	106
FIGURA 7: Chalconoides que apresentaram efeito protetor frente a ambos insultos (H ₂ O ₂ e glutamato).	106

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

TABELA 1: Sistema AT (N). Diferentes biomarcadores organizados por método de detecção associado ao processo patológico que cada um deles mede. Adaptado de JACK, et al., 2018.	51
TABELA 2: Relação de medicamentos aprovados para o tratamento da Doença de Alzheimer.	53
TABELA 3: Critérios para biodisponibilidade oral e para permeabilidade através da BHE.	69

CAPITULO II

TABELA 1: Estrutura molecular dos chalconoides e os códigos atribuídos as moléculas.	84
TABELA 2: Predição toxicológica dos chalconoides através do servidor ProTox.	88
TABELA 3: Predição de biodisponibilidade oral e capacidade de passagem através a barreira hematoencefálica (BHE) dos chalconoides.	92
TABELA 4: Separação dos chalconoides por critérios atingidos de permeação através da BHE.	94
TABELA 5: Relação ADME e predição de sitio de ação dos chalconoides, através a ferramenta Swiss.	97
TABELA 6: Viabilidade celular dos chalconoides em linhagens celulares renais sadias (VERO) e astrogial (C6) pelos métodos de MTT e SRB.	103

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	39
2.	OBJETIVOS	24
2.1.	OBJETIVO GERAL	26
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3.	CAPITULO I: Revisão bibliográfica do tema	32
3.1.	A DOENÇA DE ALZHEIMER	33
3.2.	EPIDEMIOLOGIA.....	34
3.3.	FISIOPATOLOGIA	35
3.3.1.	Fatores genéticos.....	35
3.3.2.	Hipótese amiloidogênica	36
3.3.3.	Emaranhados neurofibrilares	39
3.3.4.	Excitotoxicidade glutamatérgica	40
3.3.5.	Via da acetilcolina (Ach)	42
3.3.6.	Células da glia e a neuroinflamação	43
3.3.7.	Estresse oxidativo	46
3.4.	DIAGNÓSTICO	48
3.5.	TRATAMENTO ATUAL.....	52
3.5.1.	Inibidores da acetilcolinesterase (AChE).....	52
3.5.2.	Antagonistas dos receptores de <i>N</i> -metil-d-aspartato (NMDA)	53
3.5.3.	Terapia de suporte	54
3.6.	INVESTIGAÇÃO DE NOVOS AGENTES TERAPÊUTICOS.....	54
3.6.1.	Agentes quelantes.....	55
3.6.2.	Agentes que atuam na via amiloidogênica.....	55
3.6.3.	Imunoterapia	57

3.6.4. Agentes que interferem com a deposição, agregação e fosforilação da proteína <i>Tau</i>	59
3.7. CHALCONAS: compostos fenólicos promissores	60
3.7. Modelos <i>in silico</i> para previsão de características fármaco-similar.....	65
3.8. Modelos experimentais <i>in vitro</i> para triagem de novos agentes neuroprotetores	70
3.8.1. Modelos celulares <i>in vitro</i>	72
3.8.2. Linhagem celular C6	73
4. CAPÍTULO II: Derivados de chalconas como potencial tratamento neuroprotetor: Informações <i>in silico</i> ADME-Tox e ensaios <i>in vitro</i>	75
5. PERSPECTIVAS.....	115
6. CONCLUSÃO GERAL	121
7. REFERÊNCIAS GERAIS	125

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é o tipo de demência mais comum, representando 60% a 80% dos casos, seguida da demência vascular, demência com corpos de Lewy e demência frontotemporal (WHO, 2012). Estima-se que o número de pessoas com DA aumente significativamente nas próximas décadas devido ao aumento da expectativa de vida da população. Atualmente, a DA afeta cerca de 50 milhões de pessoas, e a estimativa é que em 2030 este número aumente para 82 milhões (PATTERSON, 2018; ALZHEIMER, 2018).

A DA ficou conhecida por meio dos estudos do médico Alois Alzheimer, em 1906. Neste estudo, uma de suas pacientes, com 50 anos, passou a apresentar perdas progressiva de memória e quadro de desorientação. Após a morte da paciente, o médico utilizou seu cérebro para embasar os estudos sobre a doença. Os sinais clínicos da DA são semelhantes àqueles evidenciados em enfermidades neurodegenerativas, como diminuição dos movimentos funcionais, dificuldades de concretizar os pensamentos por meio da fala, dificuldades de marcha e um estado de demência progressivo. Também são observados sintomas neuropsiquiátricos associados à síndrome como depressão, ansiedade, distúrbios do sono, agressividade, irritabilidade, entre outros (SILVA, 2017; ALZHEIMER, 2018).

Em nível molecular a DA é caracterizada pelo acúmulo de placas do peptídeo β -amiloide ($A\beta$), e a hiperfosforilação da proteína *Tau* com formação de emaranhados neurofibrilares em regiões do cérebro responsáveis por cognição e memória, levando a neurodegeneração progressiva (CITRON, 2010). Essas características se acumulam silenciosamente e se propagam através de regiões do sistema nervoso central (SNC) por muitos anos, levando ao declínio clínico e funcional. No estágio dos sintomas clínicos da demência, esses processos fisiopatológicos já comprometeram significativamente uma grande proporção de circuitos cerebrais envolvidos na cognição. A formação de placas compostas do peptídeo $A\beta$ no cérebro é considerada o evento neurodegenerativo inicial da DA (SCHILLING, *et al.*, 2016).

A neuroinflamação, também presente na DA, é caracterizada pela ativação do sistema imune inato, desencadeada pelas células gliais, que promovem o aumento da infiltração das células de defesa periféricas, além da produção de mediadores inflamatórios e de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ROS/RNS) (HIRSCH; HUNOT, 2009; ORRE, *et al.*, 2014). Os astrócitos desempenham papéis

chaves de manutenção cerebral, entretanto sua superativação promove a liberação de diversas citocinas, como a interleucina-1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), quimiocinas e ROS, que somado ao aumento da infiltração das células imunes, podem levar a déficits comportamentais, cognitivos e apoptose neuronal (VILLEDA, *et al.*, 2011).

Os tratamentos disponíveis para a DA baseiam-se na inibição da colinesterase, que reduz os sintomas cognitivos causados pela DA, e na modulação do sistema de neurotransmissão glutamatérgica, reduzindo os níveis de glutamato que estão elevados na DA (WHO, 2012). Esses medicamentos apenas reduzem os sintomas da doença, mas não conseguem estabilizar a progressão da mesma, além de causarem uma série de efeitos colaterais, podendo levar a tolerância do paciente ao tratamento (AISEN; CUMMINGS; SCHNEIDER, 2012). Com base nisso, é de suma importância a busca por novos agentes neuroprotetores e novas estratégias farmacológicas que sejam capazes de promover a prevenção da doença, bem como o tratamento efetivo e desaparecimento dos sintomas.

As chalconas (1,3-difenil 2-propenona) são os precursores diretos na biossíntese dos flavonoides (NAJAFIAN, *et al.*, 2010; DEWICK, 2012). Essas moléculas possuem como estrutura básica dois anéis aromáticos, unidos por um sistema de três carbonos, constituindo cetonas α , β insaturadas. Essas características estruturais das chalconas são importantes para vários efeitos biológicos descritos na literatura (RAO; TZENG, 2004).

Estudos relacionando ações de chalconas sobre o SNC ainda são bastante escassos. Alguns relatos destacam seu potencial neuroprotetor na DA, citando efeitos contra o estresse oxidativo e excitotoxicidade (BAYATI, *et al.*, 2011; PAN, *et al.*, 2012; RAMPA, *et al.*, 2016). Os efeitos das chalconas sobre células neurogliciais são ainda mais escassos. Um estudo *in vitro* com astrócitos e células microgliciais apontou efeito benéfico de um derivado chalconóide através da produção de fatores neurotróficos, como o Fator Neurotrófico Derivado de Linhagem de Célula Glial (GDNF) (ELMANN, *et al.*, 2013).

Um dos mais importantes avanços no planejamento e descoberta de novos fármacos tem sido a utilização de recursos computacionais, conhecidos como modelos *in silico*. Atualmente ferramentas *in silico* são capazes de prever propriedades físico-químicas (solubilidade, permeabilidade), farmacocinéticas

(biodisponibilidade, estabilidade metabólica) e toxicológicas, que podem levar a falha terapêutica nas etapas pré-clínicas e clínica (GANGADHARAN, *et al.*, 2017).

Aliada as predições *in silico*, a cultura de células é uma ferramenta *in vitro* amplamente utilizada para melhorar nossa compreensão sobre a morfologia, biologia e sinalização celular (EDIRIWEERA; TENNEKOON; SAMARAKOON, 2018). Apesar dos neurônios serem os alvos principais dos estudos envolvendo doenças neurodegenerativas, as células gliais possuem uma grande importância na progressão das demências e precisam ser mais exploradas (STANSLEY; POST; HENSLEY, 2012)

Desta forma, a linhagem astrogliol C6 é um modelo alternativo *in vitro* para elucidar os eventos que acontecem na DA, principalmente frente a insultos inflamatórios e oxidativos, bem como diretamente frente o peptídeo A β ou ao excesso de glutamato. Essas condições mimetizam, de maneira geral, as condições as quais os astrócitos são expostos nos diversos níveis da patofisiologia da DA (GARWOOD, *et al.*, 2010; CABEZAS, *et al.*, 2012; ZHAO, *et al.*, 2014; BOSCIA, *et al.*, 2017).

Assim, considerando a DA como uma doença neurodegenerativa progressiva altamente prevalente, descoberta há mais de 100 anos, com vários sintomas neuropsiquiátricos associados que geram custos sociais altos e afetam profundamente a qualidade de vida dos pacientes, aliado a inexistência de tratamento que estabilize a progressão da doença, é de suma importância a busca por novos agentes terapêuticos neuroprotetores que previnam a doença e sejam capazes de promover a redução efetiva dos sintomas da demência.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos neuroprotetores de compostos inéditos derivados de chalconas utilizando diferentes plataformas experimentais *in silico* e *in vitro*, com vistas à prevenção da Doença de Alzheimer.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as características fármaco-similar e o potencial de permeação na barreira hematoencefálica, dos derivados propostos, através de técnicas *in silico*;
- Selecionar os compostos mais promissores a serem testados nos modelos *in vitro* de neurotoxicidade;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos selecionados frente a diferentes linhagens celulares;
- Padronizar os protocolos de neurotoxicidade *in vitro* em modelos de células astrogliais C6 como técnica de triagem na busca de compostos ativos;
- Avaliar os efeitos neuroprotetores dos compostos selecionados, em modelos de células astrogliais C6 frente a insultos induzidos por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e glutamato.

3. CAPÍTULO I: Revisão bibliográfica do tema

3.1. A DOENÇA DE ALZHEIMER

A Doença de Alzheimer (DA) ficou conhecida por meio dos estudos do médico Alois Alzheimer, em 1906. A primeira paciente do médico foi Auguste Deter, uma mulher de 51 anos que desenvolveu delírios paranoides, perdas de memória e quadro de desorientação. Na análise *post mortem* do cérebro da paciente, Alois Alzheimer pode verificar as manifestações histológicas que hoje estão associadas à DA (SILVA, 2017).

Os sinais clínicos da DA são semelhantes àqueles evidenciados em outras enfermidades neurodegenerativas. A DA engloba uma progressão contínua com mudanças cerebrais iniciais que podem começar cerca de 20-30 anos antes do aparecimento dos sintomas clínicos. Quando as mudanças iniciais ocorrem, o cérebro aciona um mecanismo de compensação que permite que os indivíduos continuem com suas funções normalmente, sem indícios clínicos da doença. A medida que o dano neuronal aumenta, o sistema nervoso central (SNC) não pode mais compensar essas alterações e os indivíduos mostram declínio cognitivo sutil. Mais tarde, o dano neuronal é tão significativo que os indivíduos mostram declínio cognitivo acentuado, incluindo sintomas como a perda da memória, mudança de comportamento ou confusão quanto ao tempo ou ao lugar. Em estágio avançado da doença, os indivíduos apresentam prejuízo em funções corporais básicas como dificuldade de caminhar, falar e engolir (ALZHEIMER, 2018; VILLEMAGNE, *et al.*, 2013). Além da depressão, são observados outros sintomas neuropsiquiátricos associados à DA como ansiedade, distúrbios do sono, agressividade, irritabilidade, entre outros (SILVA, 2017, ALZHEIMER, 2018).

A DA é a principal causa de demência, representando entre 60% a 80% dos casos, e tem se tornado uma das principais causas de morte nos Estados Unidos. De fato, o número de óbitos causados pela DA tem aumentado expressivamente (123%), enquanto as mortes causadas por outras doenças prevalentes, como distúrbios cardíacos, têm diminuído gradualmente entre os anos 2000-2015, conforme mostra a Figura 1 (ALZHEIMER, 2018). Atribui-se a isto a falta de agentes terapêuticos eficazes, uma vez que os fármacos atualmente disponíveis no mercado somente amenizam os sintomas, sendo ineficazes para impedir a progressão da DA (WHO, 2012).

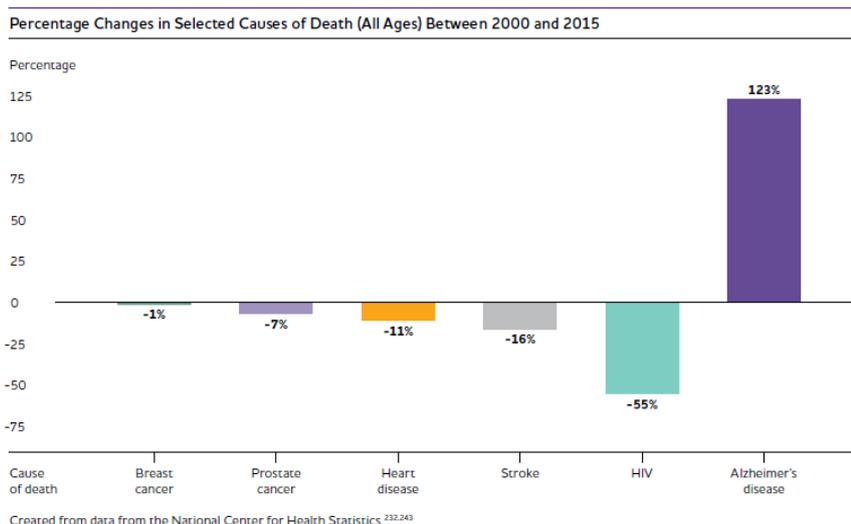


FIGURA 1: Mudanças percentuais em causas de morte entre os anos de 2000 e 2015. Fonte: ALZHEIMER, 2018

Os sintomas comportamentais e psicológicos ligados à demência afetam profundamente a qualidade de vida dos pacientes e possuem grande impacto em seus cuidadores. Neste contexto, o rastreamento e o diagnóstico precoces são passos essenciais para que as demências sejam rapidamente diagnosticadas, contribuindo para o abrandamento da evolução da doença e o adiamento dos sintomas mais severos (WHO, 2012).

3.2. EPIDEMIOLOGIA

A idade é o principal fator de risco para o desenvolvimento da DA, após os 65 anos o risco de desenvolver a doença dobra a cada 5 anos. As mulheres possuem risco maior de desenvolver Alzheimer e sugere-se que seja pelo fato de viverem mais do que os homens. O fator hereditário afeta apenas 5% de todos os acometidos pela doença e, nesses casos, possui início antes dos 65 anos. Outros fatores importantes referem-se ao estilo de vida. São considerados fatores de risco: hipertensão, diabetes, obesidade, tabagismo e sedentarismo (ABRAZ, 2019; ALZHEIMER, 2019)

Em abril de 2012, a *World Health Organization* (WHO) publicou o documento "*DEMENTIA - A Public Health Priority*", demonstrando grande preocupação com a demência que afeta a qualidade de vida das pessoas longevas, especialmente nos países em desenvolvimento (WHO, 2012).

Em todo o mundo, a cada 3 segundos um novo caso de demência é diagnosticado, em 2018 calculou-se que haviam 50 milhões de pessoas vivendo

com demência e estima-se que este número irá quase triplicar para 82 milhões em 2030. O custo total estimado da demência em todo o mundo em 2018 foi de US\$ 1 trilhão, e deve dobrar para US\$ 2 trilhões até 2030, este número inclui um custo estimado para os cuidadores "informais", além da assistência médica, medicamentos, entre outros. A DA ultrapassou o câncer e se tornou a doença mais temida da América. Ela é responsável pela morte de mais pessoas nos EUA do que o câncer de mama e o câncer de próstata juntos. Ainda nos EUA, os custos totais em 2018, para todos os indivíduos com DA ou outras demências, foram estimados em US\$ 277 bilhões (ALZHEIMER, 2018).

Já no Brasil, informações adquiridas junto ao Serviço de Informação sobre Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde (MS) referente aos anos de 2000 a 2013, indicam que foram registrados 98.016 casos de mortalidade pela DA. A região sudeste possuiu a maior prevalência com 59,45% do número de óbitos e a região Norte a menor, com apenas 1,65%. Quando analisada a mortalidade causada pela DA por unidade federativa, o estado de São Paulo obteve a maior frequência, com 32,65%, e Roraima a menor com 0,05%. O Rio Grande do Sul apresentou um percentual de 10,15% de mortes neste período (FERREIRA, *et al.*, 2015).

3.3. FISIOPATOLOGIA

Embora a doença seja multifatorial e heterogênea, ela possui certas características fisiopatológicas comuns como: placas senis formadas por agregados do peptídeo A β , deposição de emaranhados neurofibrilares (hiperfosforilação da proteína *Tau*), deficiência de acetilcolina, excitotoxicidade glutamatérgica, neuroinflamação e estresse oxidativo (HUANG; MUCKE, 2012; KRITIS, *et al.*, 2015).

As causas para o desenvolvimento da DA consistem em um complexo processo de fundamentação, pois envolvem uma combinação de fatores genéticos, moleculares e ambientais, incluindo fatores de risco em potencial como diabetes, hipertensão, obesidade, sedentarismo, depressão, fumo, entre outros (ALZHEIMER, 2018).

3.3.1. Fatores genéticos

Cerca de 1 a 5% de todos os casos de DA derivam da herança de desordens autossomais dominantes familiares em um dos genes da presenilina

(PSEN-1 e PSEN-2), localizados nos cromossomos 1 e 14, ou no gene da proteína precursora de amiloide (APP), localizado no cromossomo 21. Estes genes geram a subunidade catalítica da γ -secretase, essencial na clivagem da APP que dá origem ao peptídeo A β . A mutação destes genes causa uma alteração no processamento APP, gerando peptídeos β -amiloides mais longos ou aumentando a proporção destes que são mais hidrofóbicos e estão mais propensos à agregação (KOROLEV, 2014; SCHELTENS, *et al.*, 2016).

Já a DA esporádica é o tipo mais comum da doença, correspondendo cerca de 95% de todos os casos. Trata-se de uma patologia multifatorial, que se instala em média aos 80 anos (ALZHEIMER, 2018).

Em humanos, o gene da Apolipoproteína E (ApoE) polimórfico está presente em três diferentes isoformas alélicas (2, 3 e 4), e é responsável por controlar a homeostase do colesterol no cérebro, carrear outros lipídios essenciais aos neurônios, participar do catabolismo normal de lipoproteínas ricas em triacilglicerídeos, além de regular a agregação e eliminação de A β (LIU, *et al.*, 2013; MASTERS, *et al.*, 2015; ALZHEIMER, 2018).

Entre essas isoformas, o alelo ApoE ϵ 4 (localizado no cromossomo 19) leva à produção de uma isoforma conhecida como ApoE4 que tem baixa eficiência na ligação e transporte de A β . A isoforma ApoE ϵ 4 se liga com menos afinidade ao A β , reduzindo a sua depuração e promovendo seu acúmulo, o que leva a formação das placas senis (GIUDETTIA, *et al.*, 2016). Pelo menos 50% dos pacientes com DA possuem pelo menos um alelo ApoE ϵ 4 e a presença da isoforma ApoE4 que predispõem ao desenvolvimento da DA (VERGHESE; CASTELLANO; HOLTZMAN, 2011).

3.3.2. Hipótese amiloidogênica

Em nível molecular a DA é caracterizada pelo acúmulo de placas A β e hiperfosforilação da proteína *Tau* com formação de emaranhados neurofibrilares em regiões do cérebro responsáveis por cognição e memória, levando a neurodegeneração progressiva (CITRON, 2010). Essas alterações se acumulam silenciosamente e propagam-se através de regiões do SNC por muitos anos, levando ao declínio clínico e funcional. No estágio onde manifestam-se os sintomas clínicos da demência, esses processos fisiopatológicos já comprometeram

significativamente uma grande proporção de circuitos cerebrais envolvidos na cognição. A formação de placas compostas do peptídeo A β no cérebro é considerada o evento neurodegenerativo inicial da DA (SCHILLING, *et al.*, 2016).

De acordo com a hipótese da cascata amiloide, proposta originalmente por Hardy e Higgins (1992), o acúmulo do peptídeo A β sob a forma de placas senis (fibras insolúveis geradas pelo auto associação desse peptídeo) seria o fator que direcionaria a patogênese da doença. Sua progressão se daria com a formação de emaranhados neurofibrilares da proteína *Tau*, resultando em um desequilíbrio entre a produção e a remoção de A β , o que levaria a um quadro de disfunção sináptica, inflamação, estresse oxidativo, perda neuronal e, por fim, demência (HARDY; HIGGINS, 1992). A degeneração progressiva dos neurônios é observada principalmente no hipocampo e no córtex cerebral, áreas responsáveis pela cognição e memória (WEST, *et al.*, 1994).

A APP é uma proteína ligada à membrana de células neurais, que com a atividade da β -secretase, que faz a clivagem da extremidade N-terminal do peptídeo, e da γ -secretase, que cliva a extremidade C-terminal do peptídeo, produz o A β como um produto de degradação caracterizando o processo amiloidogênico (Figura 2). O peptídeo A β , composto de 36 a 43 aminoácidos e de massa molecular aproximada de 4 kDa, é um produto fisiológico de metabolismo humano e está presente no cérebro e no líquido cefalorraquidiano (LCR) de humanos normais ao longo da vida. A simples presença do A β não é capaz de gerar neurodegeneração, sendo que está só ocorre quando há auto associação destes peptídeos (ZIMMER, *et al.*, 2014).

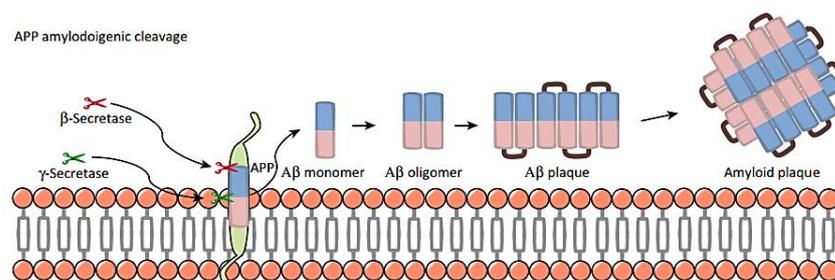


FIGURA 2: Apresentação ilustrativa da patologia amiloide: a proteína precursora amiloide (APP) é clivada pela β -secretase e γ -secretase (proteases

transmembranares), produzindo um monômero A β . A agregação de monômero produz oligômeros de A β tóxicos, que agregam ainda mais como placas A β insolúveis. Placas amiloides são agregados maduros A β com uma conformação de folha plissada em β . Fonte: ZIMMER, *et al.* 2014.

Dependendo do sítio de clivagem das enzimas no processo amiloidogênico, podem ser gerados fragmentos de oligômeros (A β _o) com diferente número de aminoácidos. Existem várias isoformas de A β : A β ₁₋₄₀, A β ₂₅₋₃₅, e A β ₁₋₄₂, este último possui 42 aminoácidos e é considerado o mais patológico, uma vez que a adição dos últimos dois aminoácidos aumenta a sua hidrofobicidade e a capacidade de formar agregados/fibrilas, o que o torna mais amiloidogênico, mais susceptível a polimerizar, logo a formar placas senis (PERL, 2010; ALVES, *et al.*, 2012).

Os A β _o estão envolvidos na desregulação sináptica e interferem com a função dos ligantes endógenos nos respectivos receptores (SAKONO; ZAKO, 2010; ALZHEIMER, 2018), internalizam receptores (ZHAO, *et al.*, 2007), hiperfosforilam a proteína estabilizadora de microtubos *Tau* (DE FELICE, *et al.*, 2008), provocam estresse oxidativo (DE FELICE, *et al.*, 2007), subregulam genes associados a função sináptica, entre outros (PAULA-LIMA, *et al.*, 2011; SEBOLLELA, *et al.*, 2012). Já o A β na forma fibrilar está envolvido na formação de placas, em várias regiões do cérebro, levando a manifestação típica da DA (SEBOLLELA, *et al.*, 2014). Quando os neurônios amadurecidos são expostos aos A β _o e/ou fibrilas, ocorre o aumento da produção de ROS, disfunção mitocondrial, apoptose e desregulação de genes antioxidantes, levando a o dano neuronal e neuroinflamação (CAROLINDAH, *et al.*, 2013).

Alternativamente, em condições fisiológicas, uma porção significativa da APP é clivada por proteases com atividade α -secretase. Nesta via não é gerado A β (via não-amiloidogênica) e esta porção atua como fator de crescimento para muitos tipos de células e promove o desenvolvimento de neuritos nos neurônios pós-mitóticos (SPENCER; MASLIAH, 2014).

Quando, por algum motivo ainda desconhecido, o corpo não consegue depurar o peptídeo, duas vias são possíveis, permanecer no meio extracelular na forma solúvel ou agregar-se formando placas e tornando-se insolúvel. No entanto, ambos os estados levam a neurodegeneração, sendo a forma solúvel a mais tóxica (MEILANDT, *et al.*, 2009; LESNÉ, *et al.*, 2013). Deste modo, a acumulação anormal

de A β , com formação de oligômeros tóxicos, resulta no desequilíbrio entre a sua produção, agregação e eliminação (CREWS; MASLIAH, 2010).

3.3.3. Emaranhados neurofibrilares

A proteína *Tau*, cujo gene está localizado no cromossomo 17q21.1, através da sua ligação à tubulina, torna-se responsável pela montagem, estabilidade dos microtúbulos e pelo transporte axoplasmático nas células neuronais (THOMAS; FENECH, 2007; HOLTZMAN, *et al.*, 2011; ALVES, *et al.*, 2012).

A conexão dos microtúbulos é regulada por uma interação complexa da expressão da isoforma *Tau* e da fosforilação da *Tau*. Na DA, esta proteína é anormalmente hiperfosforilada em resíduos de Serina/Treonina, separando-se dos microtúbulos axonais e agregando-se em emaranhados neurofibrilares no corpo celular dos neurônios, Figura 3 (ALVES, *et al.*, 2012). A degeneração neurofibrilar pode desencadear ou facilitar múltiplas alterações patológicas, incluindo deposição de A β intraneuronal, dano oxidativo, perda de atividade biológica (perda neuronal e sináptica), ativação da glia, inflamação e morte celular (THOMAS; FENECH, 2007; ALVES, *et al.*, 2012).

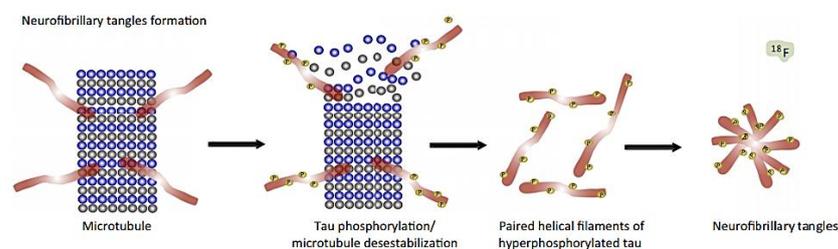


FIGURA Erro! Nenhum texto com o estilo especificado foi encontrado no documento. Formação de emaranhados neurofibrilares (NFT): A hiperfosforilação das proteínas *Tau* induz uma instabilidade massiva dos microtubos da proteína *Tau*, gerando filamentos helicoidais emparelhados. A agregação de *Tau* hiperfosforilada produz uma conformação filamentosa, denominada NFTs. Fonte: ZIMMER, *et al.* 2014.

Além das placas extracelulares de β -amiloide e dos emaranhados neurofibrilares intracelulares, a morte seletiva de células neuronais (córtex entorrinal, as camadas piramidais do hipocampo e certas áreas do neocórtex temporal, parietal e frontal) é outra característica neuropatológicas da DA (HOLTZMAN, *et al.*, 2011). Apesar da maioria destes neurônios serem glutamatérgicos há também

perda/disfunção de neurônios colinérgicos, noradrenérgicos e serotoninérgicos (HOLTZMAN, *et al.*, 2011). A perda sináptica ocorre no início da doença e antes da deposição de placas de A β e de emaranhados neurofibrilares. Quando localizada no hipocampo e no neocórtex está associada ao declínio cognitivo (ALVES, *et al.*, 2012).

3.3.4. Excitotoxicidade glutamatérgica

O conceito de excitotoxicidade foi introduzido por Olney (1990) para descrever a neurotoxicidade associada a altas concentrações do glutamato exógeno ou de agonistas de receptores glutamatérgicos (OLNEY, 1990)

O glutamato é um dos principais neurotransmissores excitatórios do SNC, contribuindo para a transmissão, desenvolvimento, diferenciação e plasticidade neurais normais. No entanto, a concentração excessiva de glutamato extracelular pode levar à despolarização contínua e descontrolada de neurônios, um processo tóxico chamado excitotoxicidade, gerando danos neuronais e eventualmente morte neuronal. A excitotoxicidade está associada a muitas condições neurodegenerativas tais como a DA, doença de Huntington, esclerose amiotrófica lateral, doença de Parkinson, acidente vascular cerebral e lesão cerebral traumática (WANG; QIN, 2010; LAI, *et al.*, 2014).

O glutamato, tanto em neurônios quanto em células da glia, é sintetizado através do ciclo do ácido tricarboxílico e adicionalmente em neurônios pelo ciclo glutamato-glutamina, onde é acumulado em vesículas para liberação futura de maneira dependente de Ca²⁺. Uma vez na fenda sináptica, ele difunde-se e interage com receptores pós-sinápticos de um neurônio adjacente (GONZALEZ, *et al.*, 2015; WANG; REDDY, 2017).

Para exercer suas funções, o glutamato age em receptores específicos localizados na superfície da membrana celular. Há dois tipos de receptores de glutamato categorizados de acordo com suas funções: receptores de glutamato metabotrópicos (mGluRs) e receptores de glutamato ionotrópicos (iGluRs) (KRITIS, *et al.*, 2015; GONZALEZ, *et al.*, 2015).

Os mGluRs são proteínas transmembrana acoplados a proteínas G que quando ativados promovem a modulação de efetores intracelulares (ativação de segundos mensageiros). Existem oito tipos diferentes de mGluRs (mGluR1 a

mGluR8), os quais são classificados em três grupos de acordo com sua estrutura e atividade fisiológica (grupos I, II e III) (KRITIS, *et al.*, 2015).

O grupo I (mGluR 1 e 5) está positivamente ligado à excitotoxicidade através da modulação da atividade do receptor de NMDA, enquanto os grupos II (mGluR 2 e 3) e III (mGluR 4, 6, 7 e 8) são negativamente relacionados com o fenômeno, através da supressão de níveis intracelulares de AMPc inibem a exportação de glutamato potencialmente neurotóxico da microglia, oferecendo um papel neuroprotetor (KRITIS, *et al.*, 2015).

Já os receptores iGluRs (NMDA, AMPA e cainato) medeiam a transmissão sináptica rápida, e quando ativados tornam-se permeáveis a cátions como sódio (Na^+) e cálcio (Ca^{2+}) (GONZALEZ, *et al.*, 2015).

A intensidade da estimulação dos receptores glutamatérgicos é proporcional a concentração do neurotransmissor no fluido extracelular. A sua excessiva liberação e conseqüente acumulação na fenda sináptica o torna tóxico devido à hiperativação de seus receptores (WANG; REDDY, 2017).

A ativação de receptores de NMDA é dependente da ligação de um agonista (glutamato ou aspartato) e também da ligação de um coagonista (glicina ou D-serina). A liberação exacerbada de glutamato, por sua vez, leva a entrada de íons Ca^{2+} nas células, através de receptores NMDA, essa hiperestimulação dos receptores leva a morte celular por necrose. Já a estimulação leve ou crônica induz a morte por apoptose. Ambas as mortes estão associadas a desregulação mitocondrial, desregulação de óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), da fosforilação oxidativa, produção de ROS, estresse do retículo endoplasmático (RE) e liberação de enzimas lisossomais (WANG; QIN, 2010; LAI; ZHANG; WANG, *et al.*, 2018; KRITIS, *et al.*, 2015)

Outro importante sistema que modula a concentração de glutamato extra e intracelular é o sistema antiporte Xc⁻. O sistema Xc⁻ é um antiporte de aminoácidos que tipicamente medeia a troca de L-cistina extracelular e L-glutamato intracelular através da membrana plasmática celular. O sistema antiporter Xc⁻ importa o aminoácido cistina, a forma oxidada da cisteína, para as células com um contra-transporte 1:1 do glutamato. Este sistema está presente no SNC principalmente em astrócitos (ALLEN, *et al.*, 2001) e microglia (PIANI; FONTANA, 1994) e confere proteção oxidativa através do fornecimento da L-cisteína intracelular que é

necessária para a síntese de glutathiona (GSH), uma substância antioxidante essencial ao SNC (BRIDGES, *et al.*, 2012; KRITIS, *et al.*, 2015).

Quando ocorre o acúmulo de glutamato extracelular, este atua como um inibidor competitivo da captação de cistina via sistema Xc⁻, levando à depleção de GSH, esta depleção de GSH influencia a capacidade das células de eliminar os radicais livres, fato que as tornam vulneráveis a eventos secundários, como o acúmulo de ROS e a alteração dos mecanismos homeostáticos do Ca²⁺, resultando em morte celular, mecanismo conhecido como toxicidade oxidativa do glutamato não mediada por Ca⁺² (KRITIS, *et al.*, 2015).

3.3.5. Via da acetilcolina (ACh)

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor liberado pelos neurônios nos sistemas nervoso periférico e central. A ACh é sintetizada pela colina acetiltransferase (ChAT) a partir de dois precursores imediatos: colina e acetilcoenzima A, sendo armazenada dentro das vesículas pré-sinápticas dos terminais axonais. Uma vez liberada pelos neurônios pré-sinápticos colinérgicos, a ACh liga-se aos receptores colinérgicos presentes nas membranas celulares pós-sinápticas ou pré-sinápticas. Posteriormente é hidrolisada em colina e acetato pela enzima acetilcolinesterase (AChE) ou pela enzima butirilcolinesterase (BuChE), esta última é menos específica e presente em menor quantidade nas sinapses neuronais. A colina resultante da hidrólise da ACh é capturada de volta ao neurônio pré-sináptico, onde é transformada em ACh por ChAT (UNZETA, *et al.*, 2016; DOUCHAMPS; MATHIS, 2017).

Constatou-se que a concentração de ACh em pacientes com DA é drasticamente menor do que em indivíduos que não apresentam a doença (FU; HUANG; SUN, 2005; DONG; FU, 2012). Isso pode ser explicado pela deficiência na atividade da enzima ChAT, somada a deficiência na recaptção do substrato colina, entre outros fatores, resultando no comprometimento das funções cognitivas. (MUSTAFA, *et al.*, 2012). O desequilíbrio dinâmico entre o neurotransmissor colinérgico e a degradação enzimática da ACh constituem a base da hipótese colinérgica (KEOWKASE; ABOUKHATWA; LUO, 2010)

Tanto a AChE quanto a BuChE desempenham papel vital na patologia da DA. Estas enzimas possuem dois sítios de ligação ao substrato: o sítio aniônico

catalítico, responsável pela própria hidrólise, e o sítio aniônico periférico (PAS) que concentra o substrato em direção ao sítio central. O A β interage com o sítio periférico, para desencadear a fibrilogênese amiloide. Os inibidores da AChE podem interagir com o sítio catalítico da enzima, assim como em seu PAS, no qual supõem-se possuir a habilidade de se ligar a peptídeos A β . Os inibidores que atuam inibindo o sítio duplo da AChE influenciam tanto na hidrólise da ACh como na agregação de A β que é dependente do PAS (INESTROSA, *et al.*, 1996; IGNASIK, M. *et al.*, 2012)

O interesse na hipótese colinérgica na demência diminuiu substancialmente nas últimas décadas, principalmente devido à limitada eficácia da atual geração de fármacos colinérgicos e do elevado número de efeitos adversos (BOHNEN, *et al.*, 2018).

3.3.6. Células da glia e a neuroinflamação

Além dos neurônios, as células neurogliais devem receber atenção especial para entender seu papel na DA, uma vez que os ensaios *in vivo* não são baseados apenas em neurônios. As células gliais estão intimamente envolvidas em uma das vias prejudiciais secundárias mais importantes da DA, a neuroinflamação, e precisam ser mais exploradas (GARWOOD, *et al.*, 2010; ZHAO, *et al.*, 2014).

A neuroglia foi caracterizada e descrita pela primeira vez por Virchow, em 1846. O termo glia (do inglês *glue*, que significa “cola”) sugere que estas células são responsáveis pela conexão entre as células nervosas. Atualmente, sabe-se que as células gliais possuem várias funções, além do suporte estrutural, como proteção e nutrição aos neurônios, modulação da transmissão sináptica (apesar de não serem eletricamente excitáveis), sendo capazes de dividir-se ao longo da vida, principalmente em resposta a danos (SOMJEN, 1988; YOUNG, 1991).

As células gliais são divididas em três principais categorias: a macroglia (composta por astrócitos e oligodendrócitos), a microglia e as células endoteliais. Os astrócitos estão envolvidos em várias funções cerebrais, sendo capazes de comunicar-se com outras células gliais e com neurônios. Os oligodendrócitos são responsáveis principalmente pela síntese de mielina. As células microgliais são células fagocíticas envolvidas na resposta inflamatória, e as células endoteliais revestem os ventrículos cerebrais (SOLITO; SASTRE, 2012; VERKHRATSKY, *et al.*, 2016).

A neuroinflamação é caracterizada pela ativação do sistema imune inato, desencadeada pelas células gliais, que promovem o aumento da infiltração das células de defesa periféricas, além da produção de mediadores inflamatórios e de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS) (ORRE, *et al.*, 2014; HENEKA, *et al.*, 2015).

A microglia está distribuída de forma onipresente no cérebro e, utilizando seus processos altamente móveis, busca identificar a presença de patógenos e detritos celulares, e simultaneamente fornecer fatores que suportam a manutenção do tecido (KETTENMANN, *et al.*, 2011). Ao mesmo tempo, a microglia contribui para a proteção e remodelamento das sinapses, manutenção e plasticidade dos circuitos neuronais (JI, *et al.*, 2013). Até certo ponto, essa ação é mediada pela liberação de fatores tróficos incluindo o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), o que contribui para a formação da memória (PARKHURST, *et al.*, 2013; HENEKA, *et al.*, 2015).

A microglia, uma vez ativada por gatilhos patológicos como morte neuronal ou agregados de proteínas, migra para o local da lesão e inicia uma resposta imune inata. A percepção de gatilhos patológicos é mediada por receptores originalmente projetados para reconhecer padrões moleculares associados ao perigo ou patógenos (DAMPs / PAMPs). Na DA, a microglia é capaz de se ligar aos oligômeros A β solúveis e fibrilas via receptores, incluindo o receptor de captura A1 de classe A, CD36, CD14, integrina α 6 β 1, CD47 e receptores *toll-like* (TLR2, TLR4, TLR6 e TLR9), que acredita-se serem parte da reação inflamatória na DA (WILKINSON; EL KHOURY, 2012; RIES; SASTRE, 2016).

O acúmulo de A β no cérebro está relacionado com a falha da microglia em remover o peptídeo A β extracelular (THÉRIAULT, *et al.*, 2015). De fato, em amostras de tecido cortical de pacientes com DA, as placas circundantes da microglia são prejudicadas na captação de A β (HENEKA, *et al.*, 2015; ARDURA-FABREGAT, *et al.*, 2017).

Já os astrócitos são essenciais para o desenvolvimento, homeostase e defesa do SNC. Por serem células versáteis são capazes de se comunicar com neurônios e outras células gliais (VERKHRATSKY, *et al.*, 2016), além de atuarem na liberação de neuromoduladores, manutenção do equilíbrio iônico, metabolismo energético, processamento de informações, manutenção da BHE e respostas

antioxidantes e inflamatórias (MARAGAKIS; ROTHSTEIN, 2006; RANSOM; RANSOM, 2012; PEREA, SUR; ARAQUE, 2014). Além disso, são responsáveis por receber e liberar glutamato e participam da síntese de GSH (KRITIS, *et al.*, 2015).

O processo de ativação celular dos astrócitos é conhecido como astrogliose reativa, e um dos principais sinais que regulam esse fenômeno é o Fator Nuclear kappa B (NF-κB), responsável pela modulação da inflamação, da sobrevivência e morte celular. Em astrócitos, a expressão de genes dependentes de NF-κB é altamente ativada na neuroinflamação (BRAMBILLA, *et al.*, 2009), além da liberação de óxido nítrico (NO) e da superprodução de ROS. Desta forma, é possível sugerir que a superativação de NF-κB, que ocorre nos astrócitos na neuroinflamação, está relacionada ao desenvolvimento de distúrbios do SNC, e que sua inativação parcial pode prevenir ou mesmo tratar doenças neurodegenerativas como a DA (KALTSCHMIDT; KALTSCHMIDT, 2009; KARUNAWEEERA, *et al.*, 2015).

Sob condições patológicas, os astrócitos exibem alterações morfológicas, incluindo hipertrofia e regulação positiva da proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Os astrócitos podem detectar proteínas agregadas tais como Aβ ou responder a moléculas inflamatórias. Sua superativação promove a síntese e liberação de diversas citocinas, como a interleucina-1β (IL-1β) e o fator de necrose tumoral α (TNF-α), quimiocinas e ROS, que somado ao aumento da infiltração das células imunes, podem levar a déficits comportamentais, cognitivos e apoptose neuronal (VILLEDA, *et al.*, 2011; ARDURA-FABREGAT, *et al.*, 2017).

Semelhante à microglia, os astrócitos reativos podem polarizar seus processos em torno de placas amiloides e são capazes de levar a degradação da placa (NAGELE, *et al.*, 2003; WYSS-CORAY, *et al.*, 2003). Na DA também são observados nos astrócitos alterações na sinalização de Ca⁺² (VINCENT, *et al.*, 2010) e um prejuízo na homeostase do glutamato (VILLEDA, *et al.*, 2011; SCIMEMI, *et al.*, 2013).

O envolvimento de oligodendrócitos na DA permanece pouco compreendido, embora existam evidências emergentes de que essas células contribuem para a patogênese e progressão de distúrbios neurodegenerativos (ETTLE, *et al.*, 2016; ARDURA-FABREGAT, *et al.*, 2017). Vários processos celulares como a neuroinflamação e o estresse oxidativo podem contribuir para a disfunção e morte dos oligodendrócitos (MITEW, *et al.*, 2010). Além disso, o peptídeo Aβ pode

prejudicar a sobrevivência e a maturação das células progenitoras de oligodendrócitos e a formação da bainha de mielina (ARDURA-FABREGAT, *et al.*, 2017; BARTZOKIS, 2011; DESAI, *et al.*, 2010)

Dessa forma, a preservação das células gliais é de grande importância para retardar a progressão de todas as doenças neurodegenerativas.

3.3.7. Estresse oxidativo

Radicais livres e espécies reativas são continuamente produzidas no organismo durante o metabolismo celular e podem desempenhar funções fisiológicas importantes, quando em concentrações baixas ou moderadas. As principais fontes de radicais livres são as organelas citoplasmáticas, que metabolizam o oxigênio, o nitrogênio e o cloro. Em função das ameaças de oxidação não controlada, a vida aeróbia desenvolveu um conjunto complexo de sistemas antioxidantes para controlar essas reações e reparar ou substituir a maquinaria celular danificada. Ao mesmo tempo, os sistemas enzimáticos evoluíram para a produção de espécies reativas, como moléculas de sinalização biológica, de reações biosintética de defesa química e de desintoxicação (LOBO, *et al.*, 2010).

Nesse contexto, o estresse oxidativo é caracterizado como um desbalanço entre a produção de ROS e a capacidade da célula de defender-se deles. O alto consumo de oxigênio e o baixo nível de antioxidantes resultam em suscetibilidade do tecido cerebral ao dano oxidativo podendo produzir o dano a lipídios, proteínas e ao ácido desoxirribonucléico (DNA), induzindo à necrose ou à apoptose (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2014; KAUSAR; WANG; CUI, 2018).

Estudos, tanto clínicos como experimentais, relatam que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na neurodegeneração em doenças como a DA (KAUSAR; WANG; CUI, 2018; LU, *et al.*, 2018). O estresse oxidativo na DA se manifesta através da presença de proteínas oxidadas, de produtos de glicação avançada, da peroxidação lipídica e da formação de espécies tóxicas, tais como peróxidos, álcoois, aldeídos, carbonilas, cetonas e de modificações oxidativas no DNA nuclear e mitocondrial (TRAMUTOLA, *et al.*, 2017).

As mitocôndrias possuem um papel muito importante em doenças neurodegenerativas, qualquer falha ou defeito em seu funcionamento levam à morte celular. Representam a principal fonte de espécies reativas e de defesas

antioxidantes nas células, além de participar ativamente da homeostase do cálcio. Desta forma, mutações no DNA mitocondrial associadas ao estresse oxidativo são os maiores fatores para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, além de contribuírem com o envelhecimento (FARSHBAF; GHAEDI, 2017; KAUSAR; WANG; CUI, 2018; GIAU; HULME, 2018; ORTIZ; SWERDLOW, 2019).

Na mitocôndria, o peptídeo A β reduz o potencial de membrana mitocondrial, inibe a cadeia transportadora de elétrons, diminui a taxa respiratória e induz a liberação de espécies reativas, favorecendo a ocorrência de apoptose. O A β pode também causar neurotoxicidade por meio da produção direta destas espécies reativas, através da interação com Cu²⁺, Fe²⁺ e Zn²⁺ (KOZLOV, *et al.*, 2017).

Na presença de tais metais de transição, observa-se que o peróxido de hidrogênio é cataliticamente convertido em radical hidroxila de alta toxicidade, pelas reações de Fenton e Haber-Weiss. Observa-se também que o A β se encontra fortemente relacionado ao dano oxidativo às membranas lipídicas, tornando-as mais hidrofílicas e alterando a função de transportadores, enzimas e receptores celulares localizados nessas membranas, além de possuírem sua conformação modificada e participarem da formação de emaranhados neurofibrilares em pacientes portadores de DA (ANSARI; SCHEFF, 2010; XIE *et al.*, 2013).

Os astrócitos desempenham um papel essencial na proteção de neurônios contra a citotoxicidade de neurotoxinas oxidativas como, por exemplo, a amônia, um produto do metabolismo de aminoácidos, que em concentrações normais, é um importante substrato para diversas reações enzimáticas sendo absorvida pelos astrócitos, e juntamente com o glutamato, convertida em glutamina pela enzima glutamina sintetase (GS) (BOBERMIN, *et al.*, 2012; ADLIMOGHADDAM, SABBIR; ALBENSI, 2016). Entretanto, sob condições de neurotoxicidade aguda da amônia a atividade da GS é diminuída (MATÉS, *et al.*, 2002), elevando o conteúdo extracelular de glutamato e levando ao processo de excitotoxicidade glutamatérgica, como citado anteriormente (MONFORT, *et al.*, 2002; HILLMANN, *et al.*, 2008).

Os efeitos metabólicos da neurotoxicidade da amônia incluem ainda alterações nos níveis de espécies reativas ROS e RNS (HIRSCH; HUNOT, 2009), estímulo do metabolismo do NO (GODÍNEZ, ROJAS, ORTUÑO, 2013) e aumento dos níveis da proteína S100B, que indica ativação glial ou morte celular (LEITE, *et al.*, 2006). Além disso, o estresse oxidativo e nitrosativo gera a fosforilação de

MAPKs (proteínas cinases ativadas por mitógenos), as quais ativam o NFκB que, por sua vez, estimula, entre outros genes, a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), responsável pela produção de grande quantidade de NO (JAYAKUMAR, *et al.*, 2006; SINKE, *et al.*, 2008).

3.4. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da DA pode ser feito pela análise de diferentes biomarcadores e pela auxílio de técnicas de neuroimagem. O cérebro pode ser examinado na sua função por testes neuropsicológicos, em sua morfologia pelas técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) e tomografia computadorizada (TAC), pela taxa de metabolismo através da tomografia por emissão de positrões (PET), e por sua atividade elétrica pelo uso do eletroencefalograma (EEG). Além dessas técnicas, podem ser realizados testes genéticos, tais como, genotipagem da ApoE, da APP e PSEN-1 e PSEN-2. Existe ainda a possibilidade de avaliar a presença de dano cerebral através da análise clínica de biomarcadores no LCR ($A\beta$ e *Tau*) (CHU, 2012).

Com o objetivo de descrever a relação entre a flutuação nos níveis dos biomarcadores nos diferentes estágios da DA, propôs-se a divisão da doença em 3 fases: DA pré-clínica (cognitivamente normal); comprometimento cognitivo leve (MCI - *mild cognitive impairment*) e demência (Figura 4).

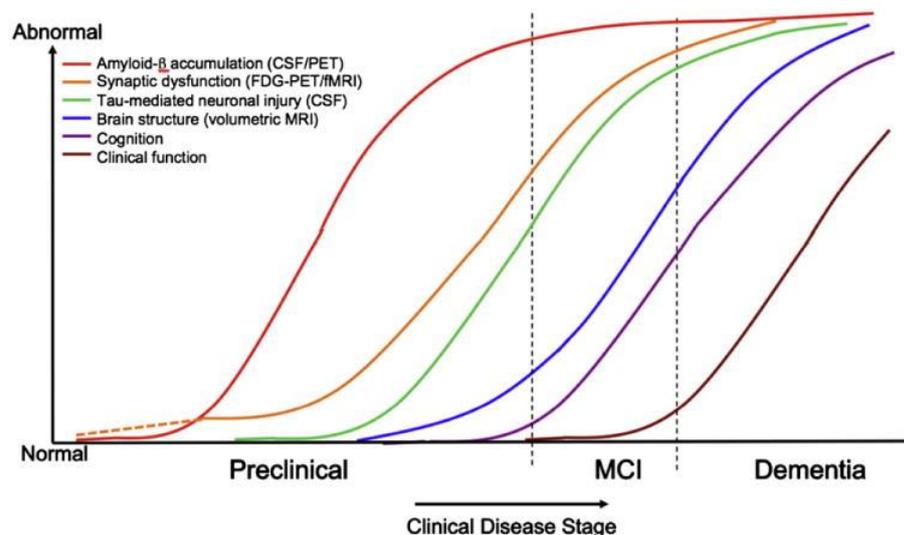


FIGURA 4: Modelo hipotético dinâmico de biomarcadores da cascata patológica da DA. Fonte: SPERLING, *et al.*, 2011.

As evidências atuais sugerem que os biomarcadores de depósito de A β precedem o de injúria neuronal, conforme esquema demonstrado na Figura 4. Estima-se que a fase de DA pré-clínica tenha início cerca de 20 a 30 anos antes do aparecimento dos primeiros sintomas clínicos. Nesse período os biomarcadores podem predizer se um indivíduo cognitivamente normal desenvolverá o curso clínico da sintomatologia da DA. Nessa primeira etapa a patologia amiloide é evidenciada pela medida de A β 42 no LCR ou por imagem de amiloide por PET, a disfunção sináptica é evidenciada por ¹⁸F-fluordesoxiglicose-PET (FDG-PET) ou MRI funcional (fMRI), e os níveis de *Tau* no LCR apresentam-se normais (SPERLING, R. A., *et al.*, 2011).

Na segunda fase, inicia-se o comprometimento cognitivo (MCI), onde além da patologia amiloide também se observa degeneração neuronal, evidenciada pelos níveis aumentados de *Tau* (total e hiperfosforilada) no LCR, além de atrofia cerebral (MRI) e início do dano cognitivo (JACK, *et al.*, 2010; SPERLING, R. A., *et al.*, 2011).

Por fim, na terceira fase, iniciam as manifestações clínicas características da DA. Os biomarcadores estão todos aumentados, sendo os níveis de *Tau* total no LCR 300% maiores em pacientes com a DA do que em indivíduos cognitivamente saudáveis (HAMPEL, *et al.*, 2004; SPERLING, R. A., *et al.*, 2011). A hipótese é de que entre as deposições de placas A β e a síndrome clínica há um intervalo de pelo menos de uma década (KUKULL, *et al.*, 2002).

Posteriormente, o trabalho desenvolvido por Leclerc e Abulrob em 2013 complementou o anterior, verificando que a disfunção astrocitária ocorre ainda na fase pré-clínica, paralela ao aumento de A β 42 no LCR. Já a ativação da microglia inicia-se no final da fase pré-sintomática e aumenta significativamente com os demais biomarcadores na fase de comprometimento cognitivo (Figura 5) (LECLERC; ABULROB, 2013).

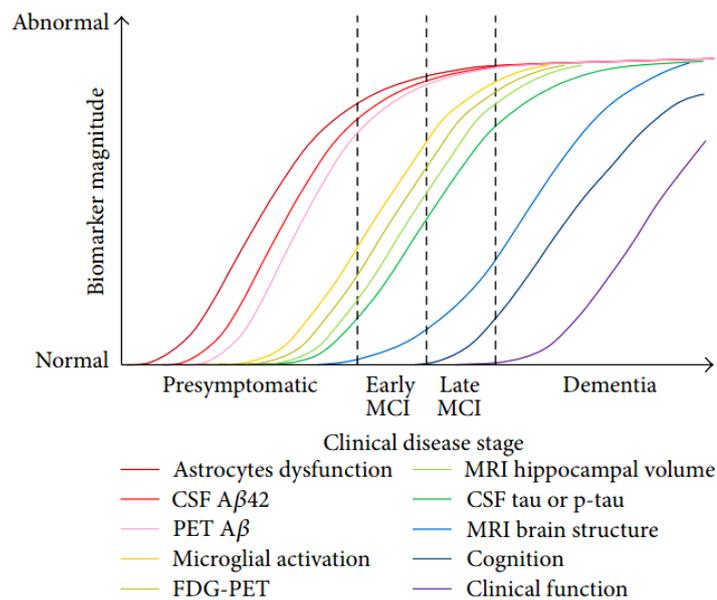


FIGURA 5: Biomarcadores cronobiológicos de acordo com o estágio clínico da doença de Alzheimer. Fonte: LECLERC; ABULROB, 2013.

Porém, é importante definir os melhores fatores que contribuem para o surgimento do comprometimento clínico, de modo que o indivíduo se beneficiará da intervenção precoce, uma vez que em alguns indivíduos apesar da presença dos biomarcadores, a DA pode não manifestar-se ao longo da vida (SPERLING, R. A., et al., 2011).

Na prática, o diagnóstico clínico da DA é feito quando os pacientes têm declínio progressivo da memória por um período superior a seis meses com consequente deterioração da saúde pessoal e das funções sociais ou ocupacionais. A presença objetiva de deterioração da memória deve ser documentada através de testes neuropsicológicos publicados pelo Instituto Nacional de Distúrbios Neurológicos e Comunicativos e Derrame e Associação de Doença e Transtornos Relacionados à DA (NINCDS-ADRDA) (DUBOIS, et al., 2007).

Existem diversos testes para realizar esta avaliação, entre os quais se destacam o *Mini-Mental State* (MMS), que avalia a capacidade de orientação no tempo e espaço, memória imediata e recente, atenção e cálculo, funções visuoespaciais e linguagem. Para superar algumas falhas que existem no MMS, foi desenvolvido outro teste cognitivo, o *Montreal Cognitive Assessment* (MoCA) que tem a capacidade de avaliar um maior número de áreas cognitivas, apresentando tarefas mais complexas, em comparação ao teste anterior e a escala *Blessed*, que avalia a capacidade de desenvolvimento das atividades cotidianas, assim como

mudanças de hábitos, de personalidade e de conduta (MCKHANN, *et al.*, 1984; DUBOIS, *et al.*, 2007; CHU, 2012).

Porém, com a introdução das diretrizes do Grupo de Trabalho Internacional (DUBOIS, *et al.*, 2007; DUBOIS, *et al.*, 2014) e do Instituto Nacional do Envelhecimento e da Associação de Alzheimer (NIA-AA) (MCKHANN, *et al.*, 2011; SPERLING, *et al.*, 2011) a incorporação de biomarcadores para as proteínas A β e *Tau*, bem como para a neurodegeneração destacaram como a patologia da DA e os sintomas resultantes não estão relacionados de uma forma proporcional e delinearum um *continuum* que abrange o estágio pré-clínico (ausência de sintomas evidentes) e clínico (LEUZY, *et al.*, 2018).

Durante o processo de diagnóstico é crucial excluir outras causas possíveis de declínio cognitivo, particularmente outros tipos de demência. A demência vascular, fronto-temporal e dos corpos de Lewy devem fazer parte do diagnóstico diferencial da DA (CHU, 2012).

O sistema de classificação agrupa diferentes biomarcadores (imagens e biofluidos) pelo processo patológico que cada um deles mede. O sistema AT (N) é flexível, pois novos biomarcadores podem ser adicionados aos três grupos AT (N) existentes (JACK, *et al.*, 2018). Para o paciente receber o diagnóstico de DA ele deve ter “A” positivo (acúmulo de placas β -amiloide), “T” positivo (presença de emaranhados neurofibrilares da proteína *Tau*), associado ou não (positivo ou negativo) com “N” neurodegeneração (Tabela 1) (JACK, *et al.*, 2018).

TABELA 1: Sistema AT (N). Diferentes biomarcadores organizados por método de detecção associado ao processo patológico que cada um deles mede.

Sigla	Alterações neuropatológicas	Biomarcadores por método de detecção		
		LCR	PET	RM
A	Deposição de placas do peptídeo β -amiloide	A β 42, ou razão A β 42/A β 40	Amiloide	-
T	Emaranhados neurofibrilares da proteína <i>Tau</i>	<i>Tau</i> fosforilada	<i>Tau</i>	-
N	Neurodegeneração ou lesão neuronal	<i>Tau</i> total	FDG	observação anatômica

LCR: líquido cefalorraquidiano; PET: tomografia por emissão de positrões; RM: ressonância magnética; FDG: ¹⁸F-fluordesoxiglicose. Fonte: JACK, *et al.*, 2018.

As diretrizes poderão ser empregadas em estudos para entender como a DA se desenvolve e para testar tratamentos direcionados às manifestações da doença facilitando a pesquisa de novos fármacos e o diagnóstico precoce (JACK, *et al.*, 2018).

3.5. TRATAMENTO ATUAL

Apesar da DA ser extensamente estudada e de todo progresso feito na investigação sobre os mecanismos patológicos da doença, ainda não se encontraram terapias efetivas para a cura ou tratamento farmacológico desta patologia. Desde 1998, houve inúmeras tentativas para desenvolver um fármaco eficaz para tratar a da, mas apenas quatro foram aprovados, sendo eles: donepezila, rivastigmina, galantamina (hipótese colinérgica) e memantina (hipótese glutamatergica) (PATTERSON, 2018).

Há ainda terapias complementares que auxiliam no controle parcial de alguns sintomas, particularmente a agitação, depressão, alucinações e delírios, que são mais frequentes com a progressão da enfermidade (ALVES, *et al.*, 2012). A seguir, estão descritas as terapias atualmente em uso.

3.5.1. Inibidores da acetilcolinesterase (AChE)

Como visto na hipótese colinérgica, os níveis de ACh estão diminuídos em pacientes que sofrem da DA. Os inibidores da AChE retardam a degradação metabólica da ACh, otimizando a disponibilidade deste substrato para a comunicação entre as células. Isto auxilia no retardo da progressão da disfunção cognitiva e pode ser eficaz para alguns pacientes nos estágios inicial e intermediário da doença (ANAND; SINGH, 2013).

Existem atualmente três medicamentos pertencentes a esta classe aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*): donepezila, rivastigmina e galantamina (Tabela 2). Esses fármacos foram liberados para sintomas leves a moderados da DA e, dentre eles, somente a donepezila foi aprovada para o tratamento de sintomas severos. Todos esses medicamentos constam na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) do Brasil (ELLUL, *et al.*, 2006; CUNNINGHAM; PASSMORE, 2013; BRASIL, 2018). A tacrina foi o primeiro fármaco aprovado (1993) e utilizado em larga escala, entretanto devido aos efeitos

secundários (principalmente hepatotoxicidade), este medicamento não é mais comercializado (RODRIGUES, et al., 2014; ANAND; SINGH, 2013)

TABELA 2: Relação de medicamentos aprovados para o tratamento da Doença de Alzheimer.

Medicamentos	Ano de aprovação	Alvos enzimáticos	Observação	Ref.
Donepezila	1996	AChE	DA severa, disponível no SUS	BARNES; YAFFE, 2005; BRASIL, 2018
Rivastigmina	2000	AChE e BuChE	Em 2007, a FDA aprovou o Exelon® Patch, um sistema transdérmico de rivastigmina, alternativo à cápsula via oral. Disponível pelo SUS (em ambas formas farmacêuticas)	ANAND; SINGH, 2013; BRASIL, 2018
Galantamina	2001	AChE	DA severa, disponível no SUS	ANAND; SINGH, 2013; BRASIL, 2018

A DA provoca degeneração de diversos sistemas neurais, além dos que utilizam ACh, o que sugere ser pouco provável que a reposição de um único neurotransmissor seja suficiente para provocar melhora sintomatológica significativa. Além disso, praticamente 60-70% das células do núcleo basal de Meynert (constituída principalmente de células neuronais de receptores colinérgicos) já degeneraram, quando os sintomas clínicos da doença se manifestaram. Portanto, uso de medicamentos anticolinesterásicos em pacientes com DA, nas fases inicial e intermediária da doença, representa apenas o início da busca de um tratamento capaz de impedir a progressão da doença. Entretanto, o ideal seria impedir a sua manifestação clínica (MASSOUD; GAUTHIER, 2010; HERRMANN, *et al.*, 2011).

3.5.2. Antagonistas dos receptores de *N*-metil-d-aspartato (NMDA)

O cloridrato de memantina foi o primeiro fármaco aprovado pelo FDA (2003) para tratar os sintomas de DA moderada a severa, sendo também o único representante da classe dos antagonistas dos receptores de NMDA. Ele regula a atividade do glutamato, promovendo um bloqueio de baixa afinidade do canal iônico do receptor

NMDA, agindo somente quando o mesmo está aberto. Assim, ele leva a um bloqueio parcial do influxo excessivo de cálcio decorrente da abertura exacerbada do canal iônico, mas ao mesmo tempo é capaz de manter a atividade do receptor em níveis fisiológicos (MOLINO, *et al.*, 2013; PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007; BUDNI, *et al.*, 2017).

O cloridrato de memantina produz uma melhora global nos aspectos comportamentais e cognitivos dos pacientes com DA, porém, ela não consegue retardar ou impedir a progressão da DA e não está presente na RENAME, ou seja, não está disponível no SUS (VAN MARUM, 2009; BRASIL, 2018).

O tratamento farmacológico atual para pessoas com algum tipo de demência é apenas sintomático e nenhum novo medicamento para DA foi aprovado nos últimos 16 anos, apesar de extensos ensaios clínicos (CUMMINGS, *et al.*, 2018).

3.5.3. Terapia de suporte

Com a progressão da DA, cerca de 60% dos pacientes passam a apresentar sintomas comportamentais e psicológicos tais como depressão, ansiedade, insônia, alucinações, ideias de perseguição, agitação e agressividade. Esses sintomas são tratados com medicamentos específicos para cada situação (WHO, 2012), sendo o uso de antidepressivos prática comum nas demências (KESSING, *et al.*, 2007).

No tratamento da depressão a Sertralina é o antidepressivo com uso mais documentado. No tratamento da agressividade, agitação e psicose são comumente utilizados fármacos neurolépticos como a Risperidona. Anti-convulsionantes como a carbamazepina também são úteis na agitação, mas é necessário cuidado com as interações farmacológicas. Os benzodiazepínicos podem ser úteis em casos pontuais, no entanto, devem ser usados por um período de tempo curto devido aos efeitos colaterais e dependência (GAUTHIER, *et al.*, 2010).

3.6. INVESTIGAÇÃO DE NOVOS AGENTES TERAPÊUTICOS

Conforme já mencionado, os medicamentos utilizados atualmente para a DA reduzem os sintomas da doença, mas não conseguem estabilizar a progressão da mesma, além de causarem uma série de efeitos colaterais, podendo levar a tolerância do paciente ao tratamento (AISEN; CUMMINGS; SCHNEIDER, 2012). Com base nisso, é de suma importância a busca por novos agentes neuroprotetores e

novas estratégias farmacológicas que sejam capazes de promover a prevenção da doença, bem como o tratamento efetivo e desaparecimento dos sintomas.

3.6.1. Agentes quelantes

Há evidências de que metais como o zinco (Zn), cobre (Cu) e ferro (Fe) interagem com o peptídeo A β , catalisando a produção de radicais hidroxila, contribuindo para o estresse oxidativo, além de estarem envolvidos na agregação do A β ₁₋₄₂, gerando fibras amiloides com maior tendência à agregação e resistentes à remoção (BUSH, 2012; SENSI, *et al.*, 2018; QU, *et al.*, 2019).

Vários agentes quelantes do Zn e do Cu demonstram inibir a agregação de A β *in vitro* e em estudos animais. O PBT2 é uma 8-OH-quinolina de segunda geração atenuante da protease-metal que afeta a oligomerização tóxica do A β (SENSI, *et al.*, 2018; ZHANG, *et al.*, 2018). Um estudo de Fase clínica IIa concluiu que o perfil de segurança é favorável para os desenvolvimentos futuros do PBT2. O efeito depurativo dos biomarcadores presentes no LCR, mas não no plasma, sugere um efeito central do composto no metabolismo A β (FAUX, *et al.* 2010; YIANNPOULOU; PAPAGEORGIU, 2013).

3.6.2. Agentes que atuam na via amiloidogênica

Segundo a hipótese anti-amiloidogênica, a prevenção da DA pode ser estabelecida através da diminuição da produção de A β , da eliminação de A β previamente formado e da prevenção da agregação de A β em placas amiloides (HONG-QI, *et al.*, 2012).

Nesse sentido, a enzima BACE1 (β -secretase), que faz a clivagem do sítio β da APP é um alvo terapêutico muito estudado (YIANNPOULOU; PAPAGEORGIU, 2013; JACOBSEN, *et al.*, 2014).

O CTS-21166 (cuja estrutura não foi revelada) é um inibidor da BACE1 que passou no ensaio clínico de Fase I, onde foram administradas doses únicas intravenosas de 7,5 a 225 mg em seis voluntários (dois indivíduos placebo) por grupo. Neste pequeno teste, a molécula foi bem tolerada em todas as doses. Embora este estudo em humanos tenha usado a administração intravenosa, o inibidor demonstrou excelentes propriedades na penetração cerebral, seletividade,

estabilidade metabólica e biodisponibilidade oral em camundongos, ratos, cães e macacos (HEY, *et al.*, 2008; MIKULCA, *et al.*, 2013).

Outro inibidor da BACE-1, chamado MK-8931 (Verubecestat), em um estudo randomizado de Fase I controlado por placebo, foi testado em indivíduos japoneses e não-japoneses através de doses única (20, 100 e 450 mg) e múltiplas (80 e 150 mg uma vez ao dia por 14 dias). Além do composto ser bem tolerado, também reduziu em ambos os grupos as concentrações médias do LCR das proteínas-amiloides (A β 40, A β 42 e sAPP β (fragmento solúvel de proteína precursora amiloide)). O A β 40 no LCR foi reduzido em média 80% 24 horas após o verubecestat em dose única (450 mg) e em média 88% 24 horas após o verubecestat em doses múltiplas (MIN, *et al.*, 2018).

Intervenções sobre a γ -secretase, outra enzima que cliva a APP, não se mostraram promissoras. O inibidor da γ -secretase mais estudado é o Semagacestat (LY 450139), o qual demonstrou reduzir de forma dose dependente a formação de A β no LCR de pessoas saudáveis (SIEMERS, *et al.*, 2005). No entanto, dois grandes ensaios clínicos de Fase III em pacientes com DA leve a moderada, foram prematuramente interrompidos devido à observação da diminuição da cognição e na funcionalidade dos pacientes que receberam o fármaco quando comparados aos que receberam o placebo (YIANNOPOULOU; PAPAGEORGIOU, 2013). O Semagacestat foi associado a maior gravidade e piora mais rápida de sintomas neuropsiquiátricos em um padrão semelhante à depressão (ROSENBERG, *et al.*, 2016; TAGAMI, *et al.*, 2017). Outro estudo com o BMS-708163 (Avagacestat), também inibidor da γ -secretase, não demonstrou eficácia (BURRELL, *et al.*, 2014; MIKULCA, *et al.*, 2013).

Outra estratégia de ação estudada foi a potenciação da α -secretase neurotrófica (não-amiloidogênica). Um estudo randomizado de Fase IIa, controlado por placebo, com o fármaco Etazolate (EHT 0202) em 159 pacientes com DA leve a moderada, apresentou-se seguro e globalmente bem tolerado, promoveu o alívio sintomático e inibiu a morte neuronal induzida por A β (VELLAS, *et al.*, 2011).

Estratégias mais recentes buscam agentes que interferem na deposição de A β , seja como inibidores da agregação do peptídeo ou promotores da desagregação de agregados pré-existentes. O único inibidor da agregação de A β a alcançar a Fase III foi o Tramiprosate (ácido glicosaminoglicano-3-amino-1-propanosulfórico), o qual

não atingiu os objetivos primários de eficácia, sendo desenvolvido um pró-fármaco deste composto chamado ALZ-801. Os testes iniciais mostraram um efeito anti-agregante e inibição da formação de oligômeros (KOCIS, *et al.*, 2017). O pró-fármaco ALZ-801 passou por um estudo randomizado, controlado por placebo, de Fase I em 127 voluntários adultos e idosos saudáveis, de ambos os sexos, avaliando sua farmacocinética clínica e segurança. Neste estudo o ALZ-801 foi bem tolerado e não houveram eventos adversos graves (EAs) ou achados laboratoriais. Os EAs mais comuns foram náusea transitória leve e alguns casos de vômitos, que não estavam relacionados à dose e mostraram desenvolvimento de tolerância após o uso continuado. A administração de ALZ-801 com alimentos reduziu significativamente a incidência de sintomas gastrointestinais em comparação com o estado de jejum, sem afetar as concentrações plasmáticas do Tramiprosate (HEY, *et al.*, 2017).

3.6.3. Imunoterapia

Com base nas duas principais hipóteses da patogênese da DA ($A\beta$ e *Tau*) foram desenvolvidas terapias baseadas na imunoterapia. As abordagens mais usadas em terapias dirigidas têm como base a administração de anticorpos (Imunoterapia passiva) ou de uma resposta imune humoral (Imunoterapia ativa) (Figura 6).

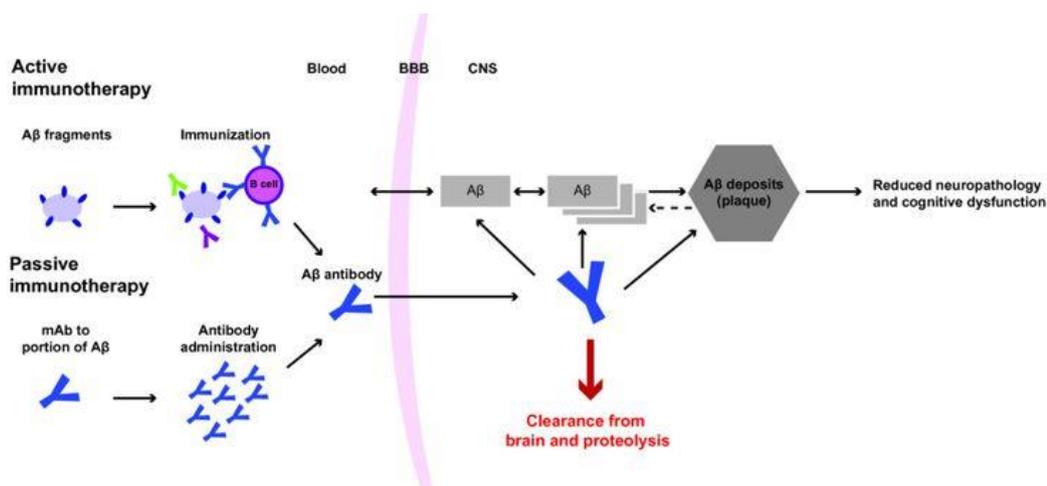


FIGURA 6: Abordagem de imunoterapia para a depuração de β -amiloide. $A\beta$, proteína β -amiloide; BBB, barreira hematoencefálica; SNC, sistema nervoso central; mAb, anticorpo monoclonal. Fonte: WINBLAD, B., *et al.*, 2014.

O conceito de imunoterapia ativa com A β para DA foi introduzido pela primeira vez em 1999 (SCHENK, *et al.*, 1999). Um dos primeiros ensaios clínicos em imunoterapia ativa foi realizado com AN1792, um peptídeo amiloide sintético (A β 42) que induz a produção de anticorpos contra o β -amiloide. O ensaio clínico de Fase II foi interrompido devido ao desenvolvimento de meningoencefalite em 6% dos indivíduos do estudo. Além disso, naqueles que não desenvolveram meningoencefalite, não houve retardo comprovado na evolução de deterioração cognitiva, apesar de uma clara redução das placas senis (GILMAN, *et al.*, 2005).

Em vista desses resultados, argumentou-se que o estudo incluiu pacientes com DA moderada e grave, e que talvez o tratamento com esse tipo de terapia poderia ser indicado em estágios iniciais da doença. Com esta recomendação, outras moléculas que utilizam a imunidade ativa para eliminar as placas amiloides estão sendo avaliadas, entre elas, o agente CAD106, que mostrou-se seguro e bem tolerado, sem quaisquer casos de meningoencefalite relatados até o momento (FARLOW, *et al.* 2015).

A respeito de imunoterapia passiva, várias moléculas foram desenvolvidas e estão atualmente em avaliação. bapineuzumab, visando a porção final N-terminal β -amiloide, foi descontinuado devido à sua baixa eficácia e perfil de segurança negativo na Fase III (SALLOWAY, *et al.* 2014; VANDENBERGHE, *et al.*, 2016). Já o solanezumab, que tem como alvo o monômero β -amiloide solúvel, apresentou um perfil de segurança adequado, e está sendo avaliado em pacientes em estágios muito precoces da DA. Nos resultados publicados o solanezumab demonstrou um aumento a proteína solúvel A β ₁₋₄₂ no LCR dos pacientes, com efeito dose-dependente, o que apoia o seu mecanismo de ação da eliminação do depósito β -amiloide. No entanto, não demonstrou eficácia clínica na DA leve (HONIG, *et al.*, 2018).

O aducanumab também está em ensaios clínicos de Fase III, sendo usado no estágio de comprometimento cognitivo leve da DA. Finalmente, o gantenerumab, que interage com fibrilas β -amiloides para recrutar microglia, ativar fagocitose e degradar placas neuríticas, está atualmente em estágios iniciais de desenvolvimento clínico e mostrou um perfil de segurança adequado para DA leve (MO, *et al.*, 2017).

Em comparação, a imunoterapia com *Tau* é um alvo terapêutico relativamente pouco explorado na DA (WANG; COLONNA, 2019). Só recentemente

alguns estudos clínicos têm avaliado a imunoterapia ativa, como por exemplo o AADvac-1, uma vacina ativa contra uma forma patogênica da proteína *Tau*, que está atualmente em Fase II, depois de ter mostrado um bom perfil de segurança (NOVAK, *et al.*, 2019). Já o C2N8E12 é um anticorpo humano anti-*Tau* que atualmente está em estudo de Fase II, e os resultados de segurança e eficácia são previstos para 2020 (BITTAR; SENGUPTA; KAYED, 2018).

Independente do alvo, a principal vantagem da imunoterapia passiva é que esta pode ser interrompida imediatamente se houver reações adversas. Entre as desvantagens podemos citar a produção onerosa, a meia-vida curta de anticorpos e a administração sistêmica crônica por via intravenosa. A administração crônica pode levar à formação de anti-anticorpos, o que poderia resultar em neutralização e/ou ter outros efeitos colaterais imunológicos indesejados como glomerulonefrite e vasculite (GU, *et al.*, 2014).

Já as vantagens da imunoterapia ativa são sua resposta imune natural, re-administrações pouco frequentes, adequado para terapia a longo prazo, custo reduzido (em comparação com a passiva) e dose baixa de antígeno. Entre as desvantagens estão o desenvolvimento de tolerância, respostas de células T autorreativas, dependência da resposta imunológica do paciente e risco de desenvolver uma resposta autoimune (WINBLAD, *et al.*, 2014; JADHAV, *et al.*, 2019).

3.6.4. Agentes que interferem com a deposição, agregação e fosforilação da proteína *Tau*

Várias abordagens terapêuticas já foram sugeridas na via da proteína *Tau*, entretanto as terapias que envolvem a inibição da fosforilação *Tau* e inibição da agregação de *Tau* são as mais estudadas (BAKOTA; BRANDT, 2016; ALZHEIMER, 2018; CHEN, *et al.*, 2018).

A fosforilação da *Tau* está sob rígido controle de várias proteínas quinases e fosfatases, as quais a fosforilam e desfosforilam, respectivamente (THOMAS; FENECH, 2007). Várias fosfoquinases têm sido implicadas na hiperfosforilação da *Tau*, como por exemplo a glicogênio sintase quinase 3 β (GSK-3 β), a quinase 5 dependente de ciclina (CDK5), a quinase 2 regulada por sinal extracelular (ERK2) e a quinase p38 α (THOMAS; FENECH, 2007; ALVES, *et al.*, 2012). O tideglusib (NP031112, NP-12), é um inibidor não competitivo da GSK-3 β que, apesar de ter

demonstrado redução dos déficits de memória espacial em camundongos transgênicos, não resultou em nenhum efeito terapêutico satisfatório durante os ensaios clínicos Fase II (del SER, *et al.*, 2013).

O inibidor direto mais comum da agregação da proteína *Tau* é o azul de metileno (MB) também encontrado na forma de cloreto de metiltionina (MTC), pertence à classe de tiazina corantes (WISCHIK, *et al.*, 1996). Estruturalmente, o MTC é um antraceno aromático, que atua como pró-fármaco e em pH ácido converte-se em leuco-metiltionínio (LMT, forma reduzida), que pode penetrar na BHE e atingir os tecidos cerebrais (BADDELEY, *et al.*, 2015). Em ensaios clínicos, o MTC foi introduzido sob o nome Rember® (TauRx Therapeutics) como um potencial candidato a fármaco anti-DA. Algumas melhorias nos sintomas relacionados à DA foram relatadas, mas a substância falhou em estudos de Fase II devido a efeitos colaterais indesejáveis, incluindo diarreia, dor ao urinar, tontura e outros. Os resultados desses estudos levaram os pesquisadores a desenvolver uma nova geração de derivados de MTC (JADHAV, *et al.*, 2019).

Um novo composto LMTM (hidro-metanossulfonato de leuco-metiltionínio), que permite a absorção direta de LMT sem a necessidade da etapa de conversão, alcançou estudos de Fase III, e foi melhor absorvido, com melhor segurança e tolerabilidade em comparação com o MCT (Rember®). No entanto, os resultados dos ensaios clínicos de Fase III envolvendo LMTM no tratamento de DA foram decepcionantes. Este estudo foi feito com 891 participantes com DA leve a moderada, um grupo recebeu 125 mg de LMTM duas vezes ao dia e outro grupo 75 mg duas vezes ao dia. Nenhuma diferença significativa nas capacidades cognitivas ou na capacidade de realizar atividades diárias foram observadas entre os grupos (GAUTHIER, *et al.*, 2016).

3.7. CHALCONAS: compostos fenólicos promissores

Os derivados flavonoídicos são os compostos polifenólicos mais importantes e podem ser encontrados em diversas espécies vegetais. A estrutura básica desses compostos consiste em 15 átomos de carbono arranjados em três anéis (C6-C3-C6), dos quais, dois anéis aromáticos (anéis A e B) são interligados através de uma estrutura heterocíclica central, o pirano (anel C), formando um núcleo aromático

denominado 2-fenil-benzopirano (Figura 7) (DI CARLO, *et al.*, 1999; SIMÕES *et al.* 2007).

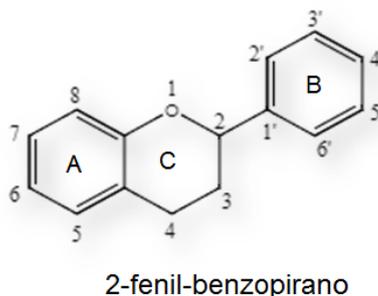


FIGURA 7: Estrutura básica dos flavonoides.

Biossintetizados pela via fenilpropanoídica, os derivados flavonoídicos são os mais frequentes polifenóis dentre os metabólitos secundários vegetais. Estes compostos são conhecidos por suas diversas propriedades farmacológicas, como anti-inflamatória e antioxidante, tornando-se potenciais agentes terapêuticos na DA. Estudos com compostos polifenólicos derivados dos flavonoides demonstraram proteção significativa das células neuronais contra a neurotoxicidade causada pelo estresse oxidativo, amenizando os efeitos deletérios do peptídeo A β (FREYSSIN, *et al.*, 2018). Dentre esses estudos podemos citar alguns resultados promissores com hesperitina (LI, *et al.*, 2017); apigenina (NABAVI, *et al.*, 2018), resveratrol (BELLAVAR, *et al.*, 2016; GOMES, *et al.*, 2018), quercetina (MORENO, *et al.*, 2017), ácido rosmarínico (CORNEJO, *et al.*, 2017; HABTEMARIAM, 2018), entre outros.

Ao longo dos últimos anos, diversas moléculas oriundas dos compostos fenólicos têm sido estudadas com objetivo de encontrar potenciais agentes neuroprotetores capazes de prevenir a DA (CHOI, *et al.*, 2014; FREYSSIN, *et al.*, 2018; SPAGNUOLO; MOCCIA; RUSSO, 2018). Em particular, o *trans*-3,5,4'-triidroxiestilbeno, mais conhecido como resveratrol, encontrado predominantemente em espécies de uvas utilizadas para a produção de vinho tinto, foi testado em diferentes modelos da DA, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, possuindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e neuroprotetoras, diminuindo a toxicidade e a agregação de peptídeos A β no hipocampo de pacientes com DA (REGE, *et al.*, 2015; GOMES, *et al.*, 2018).

As chalconas (1,3-difenil-2-propenona) são os precursores diretos na biossíntese dos flavonoides, e desta maneira são consideradas uma estrutura

simplificada dos flavonoides (NAJAFIAN, *et al.*, 2010; DEWICK, 2012). Essas moléculas possuem como estrutura básica dois anéis aromáticos, unidos por um sistema de três carbonos, constituindo cetonas α , β insaturadas, onde tanto a carbonila, quanto a porção olefínica estão ligadas a grupamentos aromáticos (Figura 8) (RAO; TZENG, 2004). Essas características estruturais das chalconas são importantes para vários efeitos biológicos que serão descritos a seguir.

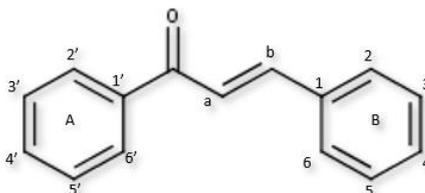


FIGURA 8: Estrutura básica das chalconas.

As propriedades biológicas e farmacológicas já descritas na literatura para as chalconas incluem: efeito antioxidante (SÖKMEN; KHAN, 2016), anti-inflamatório (MAHAPATRA; BHARTI; ASATI, 2017; ZHANG, *et al.*, 2017; ARSHAD, *et al.*, 2017), antiproliferativo, antiangiogênico (PILATOVA, *et al.*, 2010) e atividades anticancerígenas (YADAV, *et al.*, 2011; MIELCKE, *et al.*, 2012; ELKHALIFA, *et al.*, 2018).

Estudos relacionando ações de chalconas sobre o SNC ainda são bastante escassos. Os primeiros trabalhos associando derivados das chalconas com a DA foram publicados em 2007, inicialmente sugerindo estas moléculas com caráter de diagnóstico. Esses estudos sugerem o uso de chalconas radioativas como agentes de imagiologia amiloide úteis para a detecção de placas β -amiloides no cérebro de pacientes com DA (ONO, *et al.*, 2007a, ONO, 2007b, ONO, *et al.*, 2007c), esta hipótese é sustentada até hoje em dia para a detecção precoce da DA com alta precisão (KAIDE, *et al.*, 2018).

O primeiro trabalho propondo derivados de chalconas para o tratamento da DA foi publicado em 2008, onde uma chalcona-diol (Figura 9) demonstrou efeito em uma das vias relacionadas ao aprendizado e memória (sinalização de PKA/CREB), quando testada em cultura neurônios hipocampais de ratos, via esta que é inibida por concentrações sub-letais do peptídeo β -amiloide (RAHIM, *et al.*, 2008).

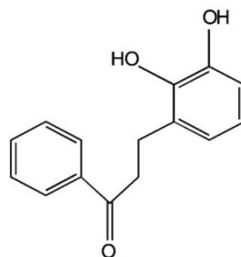


FIGURA 9: Estrutura química de um novo chalcondiol, 3-(2,3-di-hidroxifenil) -1-fenilpropan-1-ona. Fonte: AL RAHIM, M., et al., 2008.

A partir de então, estudos foram desenvolvidos relacionando seu potencial neuroprotetor na DA em diferentes alvos (BAYATI, *et al.*, 2011; PAN, *et al.*, 2012; RAMPA, *et al.*, 2016). Um derivado de chalcona (Figura 10) apresentou atividade contra o estresse oxidativo a partir da eliminação de radicais livres (72,5%) medida pelo ensaio de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila), e protegeu significativamente as células PC12 contra a morte celular neuronal induzida por A β . Em camundongos, a administração oral de 50 mg/kg/dia resultou em uma melhora significativa na aprendizagem e na memória, conforme verificado no labirinto em Y e nos testes de esquiva passiva. Em testes de toxicidade aguda, o LD50 em camundongos foi determinado em 520,44 mg/kg de peso corporal (KWAK, *et al.*, 2012)

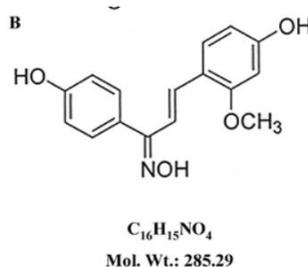


FIGURA 10: Chalcona sintetizada. Fonte: KWAK, J., et al. 2012.

A ação de redução do estresse oxidativo em modelo transgênico de *Caenorhabditis elegans* (SASHIDHARA, *et al.*, 2014) e *in vitro* com as linhagem PC12 (XIAO, *et al.*, 2017; CAO, *et al.*, 2018; WANG, *et al.*, 2018) e SH-SY5Y (RAMPA, *et al.*, 2018) também foram identificados.

A síntese de híbridos benzofurano-chalcona mostraram ação em múltiplos alvos como a diminuição da agregação de A β , aumento dos níveis de ACh, diminuição dos níveis de AChE, redução do estresse oxidativo e proporcionam

proteção contra a neurodegeneração colinérgica quimicamente induzida em modelo transgênico de *Caenorhabditis elegans* (SASHIDHARA, *et al.*, 2014).

A atividade e a seletividade dos derivados de chalconas na inibição da AChE e a BuChE também foram relatados (SHAH, *et al.*, 2017; RAMPA, *et al.*, 2017). Uma nova série de derivados de chalconas amino-alquila substituídos com flúor foi projetada, sintetizada, caracterizada e avaliada quanto à atividade inibitória contra a AChE e da BuChE. Os resultados mostraram que a alteração da posição do átomo de flúor e dos grupos aminoalquila influenciou marcadamente a atividade e a seletividade dos derivados de chalconas na inibição das enzimas. Entre eles, o composto 3l (E-3-(4-fluorophenyl)-1-(4-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)prop-2-en-1-one) demonstrou ser o mais potente inibidor da AChE ($IC_{50} = 0,21 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$), e possuir a maior seletividade para a AChE sobre a BuChE ($IS_{\text{BuChE/AChE}} = 65,0$) (LIU, *et al.*, 2015).

Um estudo envolvendo uma molécula de chalcona trihidroxilada (Figura 11) mostrou ser um bom inibidor da ferroptose (morte celular programada dependente do ferro e caracterizada pelo acúmulo de peróxidos lipídicos), atuando no sistema antiporter cistina/glutamato Xc-, além de subverter completamente a peroxidação lipídica induzida pela agregação de $A\beta_{1-42}$ em células SH-SY5Y (CONG, *et al.*, 2019)

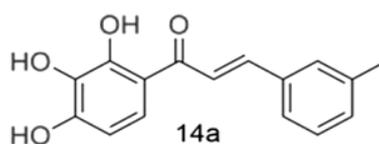


FIGURA 11: Chalcona tri-hidroxilada. Fonte: CONG, L., *et al.*, 2019.

Os efeitos das chalconas sobre células neurogliciais são ainda mais escassos. Elmann e colaboradores (2013) demonstraram que dois chalconoides (Figura 12) promoveram efeitos antioxidante através da produção de fatores neurotróficos, como o GDNF em cultura celular de astrócitos e células microgliciais (ELMANN, *et al.*, 2013).

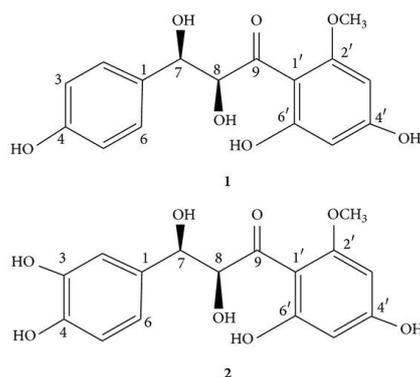


FIGURA 12: Estruturas dos chalconoides ativos. Fonte: ELMANN, A., et al., 2013.

Considerando a DA como uma doença neurodegenerativa progressiva altamente prevalente, descoberta a mais de 100 anos, com vários sintomas neuropsiquiátricos associados, que geram custos sociais altos e afetam profundamente a qualidade de vida dos pacientes e seus cuidadores; aliado a inexistência de tratamento que estabilize a progressão da doença; e o fato do tratamento atual paliativo causar uma série de efeitos colaterais e tolerância, é de suma importância a busca por novos agentes neuroprotetores e novas estratégias farmacológicas que previnam a doença e sejam capazes de promover a redução efetiva dos sintomas da demência.

3.7. Modelos *in silico* para previsão de características fármaco-similar no desenvolvimento de novos fármacos

O desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas para tratar distúrbios e doenças do SNC possui a menor chance estatística de sucesso de todas as categorias de medicamentos. O período de tempo necessário para uma potencial molécula atuante no SNC chegar ao mercado é estimado em 12-16 anos, comparado a 10-12 anos para outras doenças (ALAVIJEH, *et al.*, 2005).

Além disso, apenas 8% do número total de novas entidades químicas (NCEs) que entram na fase I do ensaio clínico para indicações do SNC, são aprovadas. Para que essas NCEs penetrem no cérebro e executem sua ação, elas devem passar pela barreira hematoencefálica (BHE), uma façanha estimada como inatingível para 98% das potenciais moléculas estudadas (PARDRIDGE, 2001; KOLA; LANDIS, 2004).

A BHE é a barreira mais limitante à permeabilidade em comparação às outras barreiras do corpo, pois é uma barreira altamente eficiente que protege o cérebro e limita o fornecimento de fármaco ao SNC. Além disso, a disfunção da BHE tem sido associada a muitos distúrbios do SNC, incluindo acidente vascular cerebral, DA, esclerose múltipla, doença de Parkinson, lesão cerebral traumática e HIV (CHEN; LIU, 2012).

A BHE é universalmente considerada como a barreira mais importante na prevenção de moléculas atingindo o parênquima cerebral através de extensos ramos de redes capilares de sangue. O principal local anatômico e funcional do BHE é o endotélio capilar cerebral. Fisiologicamente, além das células endoteliais, membrana basal, pericitos, astrócitos e microglia são partes integrantes do sistema de suporte BHE. Juntamente com os neurônios circundantes, esses componentes formam uma unidade neurovascular complexa e funcional (CHEN; LIU, 2012).

As NCEs alvo do SNC devem penetrar através desta barreira para que elas possam interagir com seu alvo terapêutico. Este transporte é predominantemente por difusão passiva transcelular, um processo que é influenciado pelas mesmas propriedades físico-químicas necessárias para o transporte através das membranas celulares e a absorção pelo trato gastrointestinal (TGI), embora com especificações muito mais rigorosas (TRIPPIER, 2016).

A presença de transportadores de efluxo na BHE serve para limitar ainda mais a penetração de moléculas ao cérebro (LOSCHER; POTSCHKA, 2005). De todos os transportadores de efluxo ativos presentes na BHE a glicoproteína-P (P-gp) é talvez o mais efetivo na extrusão de NCEs do cérebro antes que eles possam atingir seu alvo de ação (SCHINKEL, 1999; DORAN, *et al.*, 2005). Esse conjunto de fatores levou a muitos esforços para projetar modelos preditivos para avaliar tanto o potencial de passagem por membranas biológicas, como a predição de substratos da P-gp, antes da síntese de compostos para avaliação biológica (HA; HOCHMAN; SHERIDAN, 2007).

A utilização de metodologias alternativas aos estudos realizados com animais, é um grande objetivo dentro da comunidade científica, e estimulada por novas políticas e legislações regulatórias. Métodos alternativos são aqueles que seguem o princípio de um programa internacionalmente reconhecido e denominado de 3Rs (*Reduction, Refinement, Replacement*), que objetiva, entre outros, diminuir o

número de animais utilizados na pesquisa, buscando alternativas para a substituição dos testes *in vivo* (CLARK, 2018).

Um dos mais importantes avanços no planejamento e descoberta de novos fármacos têm sido a utilização de recursos computacionais, conhecidos como modelos *in silico*. Os estudos *in silico* para a previsão de propriedades ADME/Tox (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) tem ganhado cada vez mais destaque (VALERIO, 2009). Atualmente ferramentas *in silico* são capazes de prever propriedades físico-químicas (solubilidade, permeabilidade), farmacocinéticas (biodisponibilidade, estabilidade metabólica) e toxicológicas, que podem levar a falha terapêutica nas etapas pré-clínicas e clínica (GANGADHARAN, *et al.*, 2017).

A descoberta de medicamentos é um processo extremamente complexo e exigente e houve a necessidade de otimizar as propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADME/Tox) dos compostos, além da eficácia e seletividade, para aumentar o sucesso da descoberta de novos fármacos (TRIPPIER, 2016).

As propriedades fármaco-similar (*drug-like*) são definidas como um conjunto de propriedades ADME que os compostos possuem, as quais são suficientemente aceitáveis para permitir que um novo protótipo conclua com êxito os ensaios clínicos de Fase I em humanos (LIPINSKI, *et al.*, 2001). Esse termo tornou-se comumente usado após os trabalhos de Lipinski *et al.*, (2001), o qual examinou as propriedades estruturais dos fármacos que afetam as propriedades físico-químicas de solubilidade e permeabilidade e seu efeito sobre a absorção oral do fármaco.

Desta forma, para otimizar a descoberta de novos medicamentos, as características ADME/Tox têm sido levadas em consideração. O reconhecimento de que as propriedades fármaco-similar possuem um impacto significativo no desenvolvimento dos experimentos biológicos durante pesquisa de novos fármacos foi um avanço importante. A análise fármaco-similar é capaz de prever problemas como a baixa solubilidade, permeabilidade ou estabilidade no meio de ensaio, características estas que podem influenciar nos dados biológicos (TRIPPIER, 2016).

A análise prévia dessas propriedades otimiza os bioensaios, a escolha dos fluidos de dosagem e as vias *in vivo* de administração. Assim, propriedades fármaco-similar tornaram-se importantes para as pesquisas biológicas, além de

reduzir o tempo e o investimento na avaliação de toxicidade na descoberta de medicamentos (PARDRIDGE, 2012).

Os métodos *in silico* disponíveis com o auxílio de modelos computacionais são capazes de prever: (i) as propriedades estruturais e físico-químicas das novas moléculas como peso molecular (PM), constante de dissociação ácida (pKa), coeficiente de partição (LogP), coeficiente de distribuição (LogD_{7,4}), área de superfície polar (PSA), solubilidade em água (LogS), permeabilidade; (ii) as características farmacocinéticas, tais como uma estimativa de biodisponibilidade, grau de ligação a proteína plasmática, potencial de metabolismo pelas enzimas do citocromo P450 (CYP450), afinidade pela glicoproteína P (sistema de efluxo), e probabilidade de passagem através da BHE; (iii) estimar a toxicidade da molécula, através do potencial de ligação aos canais de potássio (hERG), da previsão da toxicidade aguda (DL50), nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, cardiotoxicidade, toxicidade reprodutiva (ligação ao receptor de estrogênio), carcinogenicidade, genotoxicidade, entre outros (TRIPPIER, 2016)

As propriedades físico-químicas de uma molécula estão diretamente relacionadas à sua capacidade de atravessar as barreiras do corpo, até mesmo as mais seletivas como a BHE (PAJOUHESH; LENZ, 2005). Segundo o trabalho de Lipinski, *et al.*, (2001), que instituiu a “Regra dos 5”, para atravessar a membrana celular, um composto deve atender a critérios definidos para o PM, LogP, número de doadores de hidrogênio (HBD) e número de aceptores de hidrogênios (HBA) (LIPINSKI, *et al.*, 2001).

Mais tarde um novo estudo desenvolvido por Veber e colaboradores (2002), após uma análise de 1100 medicamentos biodisponíveis oralmente, afirmou que seria necessário levar em consideração ainda o número de ligações rotacionáveis e a área de superfície polar (PSA) de uma molécula, pois quanto mais rotativas, e quanto maior o valor do PSA, menor a taxa de penetração de um composto (LIPINSKI, *et al.*, 2001; VEBER, *et al.*, 2002).

Como já mencionado, a BHE é muito seletiva e os critérios devem ser mais exigentes para prever a penetração através desta. Sendo assim, vários estudos individuais sugerindo parâmetros moleculares necessários para ultrapassar a BHE, foram realizados (WATERBEEMD, *et al.* 1998; KELDER, *et al.*, 1999; DOAN, *et al.* 2002; NORINDER, HAEBERLEIN, 2002). Entretanto, foi Clark (2003) que compilou

vários destes estudos e tornou-se conhecido pelas seis propriedades moleculares que favorecem a permeação (difusão passiva) das moléculas através da BHE, como: o PM, HBA, PSA, $\text{LogD}_{7,4}$, o LogBB (coeficiente de distribuição entre o sangue e o cérebro) e preferencialmente não possuir nenhum grupo funcional ácido (CLARK, 2003). Não há um número mínimo de critérios a serem atingidos, porém quanto mais critérios a molécula cumprir, maior a capacidade de conseguir ultrapassar a BHE.

Os critérios determinados tanto para biodisponibilidade oral, como para permeabilidade através da BHE estão disponíveis na tabela 3.

TABELA 3: Critérios para biodisponibilidade oral e para permeabilidade através da BHE.

CRITÉRIOS	BD oral _{L e V}	Permeação BHE _c
PM	≤ 500	< 450 g/mol
LogP	≤ 5.0	-
LogD _{7,4}	-	entre 1-3
HBA	≤ 10	≤ 5
HBD	≤ 5	-
PSA	≤ 140	$< 60-70$
Nº lig rotacionáveis	≤ 10	-
LogBB	-	> 0

L: regras de Lipinski, *et al.* (2001); C: regras de Clark (2003); V: regras de Veber (2002); BD: biodisponibilidade; peso molecular (PM); coeficiente de partição (LogP); sítios aceptores de hidrogênio (HBA); sítios doadores de hidrogênio (HBD); área de superfície polar (PSA); coeficiente de distribuição (LogD); coeficiente de distribuição entre sangue e cérebro (LogBB); coeficiente de solubilidade em água (LogS);

Com o advento de softwares mais potentes e precisos para simular processos (bio)químicos, um esforço significativo foi investido em modelos preditivos de penetração da BHE (VASTAG; KESERU, 2009). A previsão da penetração pela BHE é uma área complexa e desafiadora quando se considera a multiplicidade de fatores que requerem simulação, como ligação às proteínas plasmáticas, bombas de efluxo, ligação do tecido cerebral, depuração metabólica de primeira passagem, entre outros. A molécula do fármaco em análise deve, em última instância, ser sintetizada e testada quanto à penetração da BHE em sistemas *in vivo* e / ou *in vitro* (HOU; XU, 2003; GOODWIN; CLARK, 2005; VASTAG; KESERU, 2009).

O uso da previsão *in silico* fornece uma visão inicial relativamente rápida (em comparação com modelos animais) para a capacidade de penetração na BHE de moléculas em triagem. Talvez a primeira e mais amplamente utilizada predição *in*

silico da penetração da BHE seja o cálculo da lipofilia (LogP calculado) (LEO, 1993). Entretanto, hoje em dia este é apenas um aspecto físico-químico de um composto que influencia a penetração da BHE (CLARCK, 2002; WAGER, *et al.*, 2010).

Os *softwares* de previsão por computador podem restringir uma grande biblioteca de compostos àqueles com maior probabilidade de penetrar na BHE, entretanto, eles ainda não substituem os testes de permeação pela BHE *in vitro* e, posteriormente, *in vivo*, mas podem auxiliar na triagem de moléculas, assim diminuindo os custos e o tempo com metodologias biológicas (QUIGNOT, 2013).

3.8. Modelos experimentais *in vitro* para triagem de novos agentes neuroprotetores

O sistema nervoso tem uma organização altamente complexa, incluindo muitos tipos de células com múltiplas funções, com características estruturais e funcionais únicas. O estudo de sua funcionalidade ou disfuncionalidade após exposição a neurotoxinas ou neuroprotetores, constitui uma questão importante na neurociência (BARBOSA, *et al.*, 2015).

A existência de dificuldades relacionadas ao custo e tempo requeridos para estudos experimentais de neurotoxicidade com animais, bem como as preocupações éticas, levaram a limitação do uso de animais. Consequentemente, alternativas *in vitro*, proporcionando uma compreensão da base mecanicista, ao nível molecular e celular, conquistaram um importante cenário no campo da pesquisa neurotoxicológica (BARBOSA, *et al.*, 2015).

Conforme já mencionado, a utilização de metodologias alternativas aos estudos realizados com animais de laboratório é meta de longa data dentro da comunidade científica. Seguindo uma tendência mundial entre organizações não governamentais e agências reguladoras, o desenvolvimento de protocolos experimentais *in vitro*, com a utilização de culturas celulares primárias e linhagens, que permitem avaliar os danos causados à célula e à viabilidade celular, tem se tornando um modelo muito apreciado por sua reprodutibilidade, sensibilidade e rapidez (CLARK, 2018).

No campo da neurobiologia e neurotoxicologia, os modelos neuronais *in vitro* foram desenvolvidos com sucesso e empregados para tratar de questões específicas da biologia celular e do funcionamento do SNC. Além disso, estudos *in*

vitro podem fornecer uma abordagem mais apropriada quando, em muitos casos, esses estudos não podem ou são difíceis de serem realizados em animais vivos. Nesses casos, sistemas *in vitro* permitem o exame de processos mecanísticos em condições isoladas e facilitam a caracterização dos modos de ação em tecidos-alvo, elucidando informações sobre alterações celulares e moleculares causadas pela exposição aos compostos (TSAI, 2004).

No entanto, é geralmente reconhecido que os sistemas *in vitro* fornecem respostas parciais para condições complexas. Portanto, embora os estudos *in vitro* não possam substituir totalmente as condições *in vivo*, eles podem complementar as investigações com o uso de animais. Além disso, as informações obtidas também podem ser usadas no refinamento de futuros estudos *in vivo* de neurotoxicidade (BAL-PRICE, *et al.*, 2008; VISAN, *et al.*, 2012)

Entre as vantagens do uso de sistemas *in vitro* para avaliação de neurotoxicidade, podem-se citar o custo reduzido, as questões éticas, observação direta e mensuração das respostas celulares aos neurotóxicos, possibilidade de comparar curvas de resposta de concentração para diferentes compostos, estudo dos efeitos de substâncias em diferentes estágios de maturação e diferenciação, facilidade de manter e manipular, controle do tempo de exposição, estudo do efeito em uma célula específica, maior reprodutibilidade entre experimentos independentes, observação de interações diretas entre o neurotóxico e o sistema de teste e análise temporal precisa da sequência de eventos (HARRY, *et al.*, 1998; TSAI, 2004; ZURICH, *et al.*, 2013).

Já referente às limitações que esses sistemas apresentam, destacam-se a falta de funções integradas, falta da BHE, ausência de controle endócrino sistêmico, dificuldade de determinar e reproduzir os mecanismos compensatórios observados *in vivo*, não considerar a via de administração, distribuição e biotransformação da molécula no corpo, a falta do suporte nutricional proporcionado pela circulação sanguínea, entre outros (HARRY, *et al.*, 1998; TSAI, 2004).

Um objetivo primário dos sistemas *in vitro* é fornecer uma maneira rápida e confiável para triagem de produtos químicos para potencial neurotoxicidade/neuroproteção, uma vez que esses ensaios devem possuir sensibilidade, simplicidade, rapidez, economia e versatilidade (BARBOSA, *et al.*, 2015). O uso de diferentes modelos *in vitro* pode fornecer informações adicionais se

os produtos químicos apresentam efeitos diferenciais, ou apresentam diferentes potências, em células neuronais *versus* não-neuronais (COSTA, *et al.*, 2007). Além disso, a sensibilidade relativa de cada modelo *in vitro* aos efeitos tóxicos dos compostos pode também fornecer informações adicionais sobre os possíveis alvos e mecanismos envolvidos na neurotoxicidade induzida pelos compostos (SMITH, 2009; GIORDANO; COSTA, 2012).

3.8.1. Modelos celulares *in vitro*

No século XX, Harrison (1907) e mais tarde Carrel (1912) desenvolveram e aperfeiçoaram o cultivo celular para estudar o comportamento das células de animais fora do organismo, através de um meio ambiente controlado. Os primeiros experimentos foram obtidos através de fragmentos de tecidos retirados de animais e armazenados em seus próprios fluidos, devido a isso essa técnica ficou conhecida, por mais de 50 anos, como cultura de tecidos. Hoje em dia esse termo é usado para denominar cultura de tecidos, células e órgãos, genericamente (ALVEZ; GUIMARÃES, 2010).

Harrison (1907) levou em consideração as necessidades básicas das células para desenvolver minuciosamente um experimento que reproduzisse tais condições (ASSIS, *et al.*, 2007). Anos mais tarde, 1912, Alexis Carrel, desenvolveu um modelo de cultivo onde descobriu a importância da troca de fonte dos nutrientes da cultura, pois a renovação constante de nutrientes permite que as células sejam cultivadas por períodos muito maiores (AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011).

Em 1962 no Japão, Nakamura e colaboradores, desenvolveram a linhagem VERO, oriunda de rim de macaco verde-africano (*Cercopithecus aethiops*) e uma das poucas células utilizadas e aprovada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para produção de vacinas (ALVEZ; GUIMARÃES, 2010). Atualmente esta linhagem continua sendo amplamente usada como uma importante ferramenta para avaliação de nefrotoxicidade (FRANÇA *et al.*, 2014; PEROPADRE *et al.*, 2011).

Com o passar dos anos, muitas linhagens foram desenvolvidas e a cultura celular não se limita mais ao comportamento de determinado tecido ou célula *in vitro*, atualmente a cultura de células é amplamente utilizada em testes de toxicidade de medicamentos, tratamento de doenças degenerativas, entre outros. Existem muitas vantagens no uso da cultura de células como modelo experimental, o

controle do ambiente, a homogeneidade da amostra, quando comparada ao uso de animais em experimentos, e a economia, são as principais vantagens dessa técnica. Atualmente, com a implementação da Comissão de Ética do Uso de Animais em Pesquisa (CEUA), a cultura de células é o principal modelo alternativo para substituir o uso dos animais em experimentos de pesquisa (AMARAL, 2010; BARBOSA, 2015).

3.8.2. Linhagem celular C6

A linhagem celular C6 tem sido amplamente utilizada para investigar processos neurológicos *in vitro*, caracterizar as respostas farmacológicas e toxicológicas às substâncias neuroativas (QUINCOZES-SANTOS, *et al.*, 2009; QUINCOZES-SANTOS, *et al.*, 2010). O glioma C6 é uma linhagem neuronal que teve origem na década de 60 sendo morfologicamente similar a glioblastomas. Este foi obtido a partir da administração repetitiva do agente alquilante N-nitrosometiluréia em ratos da linhagem Wistar que foram sacrificados após desenvolvimento de sinais neuropatológicos, e tiveram as células tumorais posteriormente cultivadas (BENDA, *et al.*, 1968).

Mais tarde, em 1980, Parker constatou que esta linhagem celular apresentava características de oligodendrócitos, astrócitos e neurônios, dependendo do número de passagens em culturas (acima de 88 passagens) (PARKER *et al.*, 1980). Assim, partir desses dados, a linhagem de glioblastoma C6 de passagem tardia é também denominada de linhagem astrogliar C6 por apresentar características de uma célula astrocitária, a linhagem astrogliar C6 também é utilizada para investigações bioquímicas e metabólicas que envolvam as funções astrocíticas como a absorção de glutamato, a atividade da glutamina sintetase (GS), o teor de glutatona (GSH), as respostas oxidativas e inflamatórias e as vias de sinalização (MANGOURA, *et al.*, 1989; CECHIN, *et al.*, 2005; FUNCHAL, 2005; KLEINKAUF-ROCHA, *et al.*, 2013).

Como citado anteriormente, as células neurogliais estão muito envolvidas no processo neuroinflamatório das demências e a linhagem astrogliar C6, é um excelente modelo para elucidar *in vitro* os eventos que ocorrem na DA, principalmente frente a insultos como LPS, H₂O₂ e glutamato (KRITIS, *et al.*, 2015; QUINCOZES-SANTOS, *et al.*, 2010; CABEZAS, *et al.*, 2012; EREMINAS, *et al.*,

2017), que produzem efeitos inflamatórios, oxidantes e excitotoxicidade glutamatérgica, bem como diretamente frente ao peptídeo A β . Essas condições mimetizam, de maneira geral, as condições patofisiológicas que os astrócitos são expostos nos diversos níveis da DA (GARWOOD, *et al.*, 2010; ZHAO, *et al.*, 2014; BOSCIA, *et al.*, 2017).

4. CAPÍTULO II: Derivados de chalconas com potencial efeito neuroprotetor: informações *in silico* ADME-Tox e ensaios *in vitro*

O texto completo do capítulo 2, bem como as perspectivas futuras compreendidas entre as páginas 76 – 120, foi suprimido por tratar-se de um material confidencial em fase de término para publicação e sujeito a depósito de patente. Consta da descrição a predição ADME-TOX *in silico*, de derivados chalconoides com indicação ao sistema nervoso central (SNC) visando a prevenção de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, além da triagem da citotoxicidade *in vitro* e da avaliação da atividade neuroprotetora frente a injúrias oxidativa e glutamatérgica em linhagem astrogliar C6.

Trinta moléculas foram desenvolvidas, após a análise dos resultados, três derivados inéditos, possuindo baixa toxicidade, ótima biodisponibilidade oral, potencialmente capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e ação protetora frente aos insultos testados, foram escolhidas como potenciais candidatas na continuação dos estudos futuros visando patologias do SNC.

6. CONCLUSÃO GERAL

Cada vez mais metodologias *in silico* e *in vitro* tornam-se importantes na triagem de moléculas, quando há um grande número de estruturas moleculares estes métodos são úteis para orientar a seleção de quais substâncias químicas investir, com o objetivo final de encontrar substâncias que apresentem alta atividade biológica juntamente com baixa toxicidade.

Não há dúvidas que a estimativa precoce de ADME/Tox na fase de descoberta reduz drasticamente o percentual de falha relacionada à farmacocinética nas fases clínicas. Modelos computacionais têm sido fomentados como uma alternativa válida aos procedimentos experimentais para predição de ADME/Tox, especialmente nas etapas iniciais do desenvolvimento, quando as estruturas químicas investigadas são numerosas, mas a disponibilidade de compostos é baixa.

A metodologia alternativa *in vitro*, torna-se aliada a análise *in silico* tornando-se de grande importância para a certificação dos resultados. A utilização de metodologias *in vitro* envolvendo células gliais para compreensão de doenças neurodegenerativa vem crescendo bastante nos últimos anos, entretanto são escassos os estudos relacionando as chalconas e seus efeito sobre células gliais em doenças neurodegenerativas.

A DA é a maior causa de demência e ainda é uma doença que não possui cura. Os tratamentos atualmente disponíveis não conseguem retardar a sua progressão, apenas tratar os sintomas. O último medicamento aprovado para tratamento dos sintomas foi há 16 anos (2003), por isso a busca por novas alternativas terapêuticas é de grande importância.

Nesse trabalho iniciamos o processo de triagem com 30 moléculas inéditas derivadas do esqueleto das chalconas, e após todas as etapas de análise e seleção, tanto *in silico* como *in vitro*, obtivemos três moléculas (CHA 16, CHA 27, L315) mais promissoras para darmos continuidade as investigações.

7. REFERÊNCIAS GERAIS

- ABBOTT, N. J., *et al.* Structure and function of the blood-brain barrier. **Neurobiol. Dis.**, v. 37, p. 13-25, 2010.
- ABRAZ. Associação Brasileira de Alzheimer. Acesso em: 13 de fevereiro de 2019. Disponível em < <http://abraz.org.br/web/>>
- ADLIMOGHADDAM, A.; SABBIR, M. G.; ALBENSI, B. C. Ammonia as a Potential Neurotoxic Factor in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 9, n. 57, 2016.
- AISEN, P. S.; CUMMINGS, J.; SCHNEIDER, L. S. Symptomatic and Nonamyloid/Tau Based Pharmacologic Treatment for Alzheimer Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 3, p. a006395–a006395, 2012.
- AL RAHIM, M., *et al.* A novel diol-derivative of chalcone produced by bioconversion, 3-(2,3-dihydroxyphenyl)-1-phenylpropan-1-one, activates PKA/MEK/ERK signaling and antagonizes A β -inhibition of the cascade in cultured rat CNS neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 600, n. 1-3, p. 10–17, 2008.
- ALAVIJEH, M. S., *et al.* Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery. **NeuroRx**, v. 2, p. 554-571, 2005.
- ALLEN, J. W.; SHANKER, G.; ASCHNER, M. Methylmercury inhibits the *in vitro* uptake of the glutathione precursor, cystine, in astrocytes, but not in neurons. **Brain Res.**, v. 894, p. 131–140, 2001.
- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo Celular. In: FUNDAÇÃO OWALDO CRUZ (Org.). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratório de saúde. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, v. 2, Cap. 5, Rio de Janeiro, 2010, p. 215-253. <http://www.epsjv.fiocruz.br/publicacao/livro/conceitos-e-metodos-para-formacao-de-profissionais-em-laboratorios-de-saude-volum-2>
- ALVES, L., *et al.* Alzheimer's disease: a clinical practice-oriented review. **Front. Neurol.**, v. 3, n. 63, 2012.
- ALZHEIMER. 2018 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 14, p. 367-429, 2018.
- ALZHEIMER. Acesso em: 13 de fevereiro de 2019. Disponível em < <https://www.alz.org/br/demencia-alzheimer-brasil.asp>>

- AMARAL, J. B. de. **Células MCF-7 como modelo 3D no estudo de câncer de mama humano**. 2010. 43f. Tese (doutorado em Biologia celular e tecidual) – Universidade de São Paulo, SP.
- AMARAL, J. B.; MACHADO-SANTELLI, G. M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia, Rio Claro**, v. 34, p.1-20, 2011.
- ANAND, P.; SINGH, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Arch Pharm. Res.**, v. 36, n. 4, p. 375-99, 2013.
- ANSARI, M. A.; SCHEFF, S. W. Oxidative Stress in the Progression of Alzheimer Disease in the Frontal Cortex. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 69, n. 2, p. 155–167, 2010.
- ARDURA-FABREGAT, A., *et al.* Targeting Neuroinflammation to Treat Alzheimer's Disease. **CNS drugs**, v. 31, n. 12, p. 1057-1082, 2017.
- ARSHAD, L., *et al.* Immunosuppressive Effects of Natural α,β -Unsaturated Carbonyl-Based Compounds, and Their Analogs and Derivatives, on Immune Cells: A Review. **Frontiers in Pharmacology**, v.8, n. 22, 2017.
- ASSIS, M. F. L., *et al.* Uso da cultura de células em testes diagnósticos laboratoriais em medicina e biologia. **Cad. saúde colet.**, v. 15, n. 3, p. 425-432, 2007.
- BADDELEY, T. C., *et al.* Complex disposition of methylthioninium redox forms determines efficacy in tau aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 352, p. 110–8, 2015.
- BAKOTA, L.; BRANDT, R. Tau Biology and Tau-Directed Therapies for Alzheimer's Disease. **Drugs**, v. 76, n. 3, p. 301–313, 2016.
- BAL-PRICE, *et al.* Application of in vitro neurotoxicity testing for regulatory purposes: Symposium III summary and research needs. **NeuroToxicology**, v. 29, n. 3, p. 520–531, 2008.
- BARBOSA, D. J., *et al.* In vitro models for neurotoxicology research. **Toxicology Research**, v. 4, n. 4, p. 801–842, 2015.
- BARBOSA, *et al.* Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, n. 2, p. 334-347, 2015.

- BARNES, D. E.; YAFFE, K. Vitamin E and Donepezil for the Treatment of Mild Cognitive Impairment. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 9, p. 951–952, 2015.
- BARTZOKIS, G. Alzheimer's disease as homeostatic responses to age-related myelin breakdown. **Neurobiol. Aging**, v. 32, n. 8, p. 1341–1371, 2011.
- BAYATI, S., *et al.* Protective effects of 1,3-diaryl-2-propen-1-one derivatives against H₂O₂-induced damage in SK-N-MC cells," **Journal of Applied Toxicology**, v. 31, n. 6, p. 545–553, 2011.
- BELLAVER, B., *et al.* Signaling mechanisms underlying the glioprotective effects of resveratrol against mitochondrial dysfunction. **Biochimica et Biophysica Acta** , v. 1862, n. 9, p. 1827–1838, 2016.
- BENDA, P. *et al.* Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. **SweetScience**, v. 161, p. 370-371, 1968.
- BITTAR, A.; SENGUPTA, U.; KAYED, R. Prospects for strain-specific immunotherapy in Alzheimer's disease and tauopathies. **NPJ Vaccines**, v. 3, n. 9, 2018.
- BOBERMIN, L. D., *et al.* Resveratrol Prevents Ammonia Toxicity in Astroglial Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.
- BOHNEN, N. I., *et al.* Recent Advances in Cholinergic Imaging and Cognitive Decline—Revisiting the Cholinergic Hypothesis of Dementia. **Current Geriatrics Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2018.
- BOSCIA, F., *et al.* The Expression and Activity of K V 3.4 Channel Subunits Are Precociously upregulated in Astrocytes Exposed to A β oligomers and in Astrocytes of Alzheimer's Disease Tg2576 Mice. **Neurobiology of Aging**, p. 1-12, 2017.
- BRAMBILLA, R., *et al.* Transgenic Inhibition of Astroglial NF- κ B Improves Functional Outcome in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Suppressing Chronic Central Nervous System Inflammation. **Journal of immunology**, v. 182, n. 5, p. 2628-2640, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais : RENAME 2018** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos

- Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017. 210 p.
- BRIDGES, R. J., **et al.** System xc⁻ cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS. **British journal of pharmacology**, v. 165, n.1, p. 20-34, 2012.
- BURRELL, R. C., *et al.* Synthesis of carbon-14 and stable isotope labeled Avagacestat: a novel gamma secretase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, v. 57, n. 10, p. 600–605, 2014.
- BUSH, A. I. The Metal Theory of Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 33, n. 1, p. 277–281, 2012.
- CABEZAS I. L., *et al.* The role of glial cells in Alzheimer's disease: potential therapeutic implications. **Neurologia.**, v. 29, n. 5, p. 305-309, 2012.
- CAO, Z., *et al.* Design, synthesis and evaluation of 4'-OH-flurbiprofen-chalcone hybrids as potential multifunctional agents for Alzheimer's disease treatment. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 1102–1115, 2018.
- CAROLINDAH, M. N., *et al.* An overview of in vitro research models for Alzheimer's disease (AD). **Regenerative Research**, v. 2, n. 2, p. 8-13, 2013.
- CECHIN, S.R. *et al.* Signal transduction mechanisms involved in the proliferation of C6 glioma cells induced by lysophosphatidic acid. **Neurochem Res.**, v.30, n. 5, p. 603-11, 2005.
- CHEN, Q., *et al.* Tau-Targeted Multifunctional Nanocomposite for Combinational Therapy of Alzheimer's Disease. **ACS Nano.**, p. 12, n. 2, p. 1321–1338, 2018.
- CHEN, Y.; LIU, L. Modern methods for delivery of drugs across the blood–brain barrier. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 7, p. 640-665, 2012.
- Cho, Y., Zhao, C. L., & Lu, H. (2017). *Trends in high-throughput and functional neuroimaging in Caenorhabditis elegans*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 9(3), e1376.
- CHOI, S. M. *et al.* Effects of Flavonoid Compounds on beta-amyloid-peptide-induced Neuronal Death in Cultured Mouse Cortical Neurons. **Chonnam Med J.**, v. 50, p. 45-51, 2014.

- CHU, L. Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. **Hong Kong Med J.**, v. 18, n. 3, p.228–37, 2012.
- CITRON, M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 9, p. 387-398, 2010.
- CLARK, J. M. The 3Rs in research: A contemporary approach to replacement, reduction and refinement. **British Journal of Nutrition**, v. 120, n. S1, p. S1-S7, 2018.
- CONG, L., *et al.* On the role of synthesized hydroxylated chalcones as dual functional amyloid- β aggregation and ferroptosis inhibitors for potential treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2019.
- CORNEJO, A., *et al.* Rosmarinic acid prevents fibrillization and diminishes vibrational modes associated to β sheet in tau protein linked to Alzheimer's disease. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 945–953, 2017.
- COSTA, L. G., *et al.*, An in vitro approach to assess the toxicity of certain food contaminants: methylmercury and polychlorinated biphenyls. **Toxicology**, v. 237, p. 65-76, 2007.
- CREWS, L.; MASLIAH, E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Hum. Mol. Genet.**, v. 19, p. 12-20, 2010.
- CUMMINGS, J., *et al.* Alzheimer's disease drug development pipeline: 2018. **Alzheimers Dement.**, v. 4, p. 195–214, 2018.
- CUNNINGHAM, E. L.; PASSMORE, A. P. Drug development in dementia. **Maturitas**, v. 76, n. 3, p. 260–266, 2013.
- DE FELICE f. G., *et al.* Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-Methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. **Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 15, p. 11590-11601, 2007.
- DE FELICE f. G., *et al.* Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. **Neurobiology of aging**, v. 29, n. 9, p. 1334-47, 2008.
- del Ser, T., *et al.* Treatment of Alzheimer's disease with the GSK-3 inhibitor tideglusib: a pilot study. **J. Alzheimers Dis.**, v. 33, p. 205–215, 2013.

- DESAI, M. K., *et al.* Early oligodendrocyte/myelin pathology in Alzheimer's disease mice constitutes a novel therapeutic target. **Am. J. Pathol.**, v. 177, n. 3, p. 1422–1435, 2010.
- DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach : Paul M. Dewick. – 2nd ed., 2012. Disponível em: <<https://nadjeeb.files.wordpress.com/2009/10/dewick-natural-prod.pdf>>.
- DI CARLO, G., *et al.* Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.
- DOAN, K. M., *et al.* Passive permeability and P-glycoprotein- mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non- CNS marketed drugs. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 303, p. 1029–1037, 2002.
- DONG, Z.; FU, A. Prevention of age-related memory deficit in transgenic mice by human choline acetyltransferase. **European Journal of Pharmacology**, v. 683, n. 3, p. 174–178, 2012.
- DORAN, A., *et al.* The impact of Pglycoprotein on the disposition of drugs targeted for indications of the central nervous system: evaluation using the MDR1A/1B knockout mouse model. **Drug Metab. Dispos.**, v. 33, p. 165-174, 2005.
- DOUCHAMPS, V.; MATHIS, C. A second wind for the cholinergic system in Alzheimer's therapy. **Behavioural Pharmacology**, v. 28, p. 112–123, 2017.
- DUBOIS, B., *et al.* Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. **Lancet Neurol.**, v. 6, p. 734–46, 2007.
- DUBOIS, B., *et al.* Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. **Lancet Neurol.**, v. 13, n. 6, p. 614–29, 2014.
- ELKHALIFA, D., *et al.* Targeting Triple Negative Breast Cancer Heterogeneity with Chalcones: A Molecular Insight. **Journal of Drug Targeting**, p. 1–25, 2018.
- ELLUL, J., *et al.* The effects of commonly prescribed drugs in patients with Alzheimer's disease on the rate of deterioration. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, p. 78, n. 3, p. 233–239, 2006.
- ELMANN, A., *et al.* Protective and antioxidant effects of a chalconoid from *Pulicaria incisa* on brain astrocytes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Article ID 694398, 10p, 2013.

- EREMINAS, G., *et al.* Neuroprotective properties of anthocyanidin glycosides against H₂O₂-induced glial cell death are modulated by their different stability and antioxidant activity in vitro. **Biomed Pharmacother.**, v. 94, p. 188-196, 2017.
- ETTLE, B.; SCHLACHETZKI, J. C. M.; WINKLER, J. Oligodendroglia and myelin in neurodegenerative diseases: more than just bystanders?. **Mol. Neurobiol.**, v. 53, n. 5, p. 3046–3062, 2016.
- FARLOW, M. R., *et al.* Long-term treatment with active A β immunotherapy with CAD106 in mild Alzheimer's disease. **Alzheimer's Res Ther.**, v. 7, n. 1, p. 23, 2015.
- FARSHBAF M. J.; GHAEDI, K. Huntington's Disease and Mitochondria. **Neurotox Res.**, v. 32, n. 3, p. 518-529, 2017.
- FAUX, N., *et al.* PBT2 rapidly improves cognition in Alzheimer's disease: additional phase II analyses. **J Alzheimers Dis.**, v. 20, p. 509–516, 2010.
- FERREIRA, A. B. T., *et al.* Mortalidade pela Doença de Alzheimer no Brasil-Entre 2000 a 2013. **Acta de Ciências e Saúde**, v.1, n.4, 2015.
- FRANÇA, F. D., *et al.* Amphotericin B nephrotoxicity in vitro: Differential profile of PKC signaling in VERO and MDCK cell lines. **Current Topics in Toxicology**, v. 9, p. 15–19, 2014.
- FREYSSIN, A., *et al.* Natural polyphenols effects on protein aggregates in Alzheimer's and Parkinson's prion-like diseases. **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 6, p. 955-961, 2018.
- FU, A. L.; HUANG, S. J.; SUN, M. J. Complementary remedy of aged-related learning and memory deficits via exogenous choline acetyltransferase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 336, n. 1, p. 268–273, 2005.
- FUNCHAL, C. *et al.* Branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease induce reorganization of phosphorylated GFAP in C6-glioma cells. **Metab Brain Dis.**, v. 20, n. 3, p. 205-17, 2005.
- GANGADHARAN N. T.; VENKATACHALAM A. B.; SUGATHAN S. High-Throughput and In Silico Screening in Drug Discovery. **Bioresources and Bioprocess in Biotechnology**, p. 247-273, 2017.

- GARWOOD, C. J., *et al.* Astrocytes are important mediators of Ab-induced neurotoxicity and tau phosphorylation in primary culture. **Cell Death and Disease**, v. 2, e167, 2010.
- GAUTHIER, S., *et al.* Efficacy and safety of tau-aggregation inhibitor therapy in patients with mild or moderate Alzheimer's disease: a randomised, controlled, double-blind, parallel-arm, phase 3 trial. **Lancet**, v. 388, p. 2873–2884, 2016.
- GAUTHIER, S., *et al.* Management of behavioral problems in Alzheimer's disease. **Int. Psychogeriatr.**, v. 22, n. 3, p. 346-72, 2010.
- GILMAN, S., *et al.* Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. **Neurology.**, v. 64, n. 9, p. 1553-62, 2005.
- GIORDANO, G.; COSTA, L. G. Developmental Neurotoxicity: Some Old and New Issues. **ISRN Toxicology**, v. 2012, 1–12, 2012.
- GIUDETTIA, A. M., *et al.* The Role of Brain Cholesterol and its Oxidized Products in Alzheimer's Disease. **Current Alzheimer Research**, v. 13, n. 2, p.198-205, 2016.
- GOMES, B. A. Q., *et al.* Neuroprotective Mechanisms of Resveratrol in Alzheimer's Disease: Role of SIRT1. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1–15, 2018.
- GONZALEZ, J., *et al.* NMDARs in neurological diseases: a potential therapeutic target. **Int J Neurosci.**, v. 125, n. 5, p. 315–327, 2015.
- GOODWIN, J. T.; CLARK, D. E. In silico predictions of bloodbrain barrier penetration: Considerations to "keep in mind". **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 315, p. 477-483, 2005.
- GU, H., *et al.* Advances in the development of antibody-based immunotherapy against prion disease. **Antibody Technology Journal**, v. 2014, n. 4, p. 45-55, 2014.
- HA, S. N.; HOCHMAN, J.; SHERIDAN, R. P. Mini review on molecular modeling of P-glycoprotein (Pgp). **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 7, p. 1525-1529, 2007.
- HABTEMARIAM, S. Molecular Pharmacology of Rosmarinic and Salvianolic Acids: Potential Seeds for Alzheimer's and Vascular Dementia Drugs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 458, 2018.

- HAMPEL, H., *et al.* Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study. **Arch Gen Psychiatry**, v. 61, n. 1, p. 95–102, 2004.
- HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, v. 256, n. 5054, p. 184-5, 1992.
- HARRY, G. J., *et al.* in vitro techniques for the assessment of neurotoxicity. **Environ. Health Perspect.**, v. 106, p. 131–158, 1998.
- HENEKA, M. T., *et al.* Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p. 388–405, 2015.
- HERRMANN, N., *et al.* Current and Emerging Drug Treatment Options for Alzheimer's Disease. **Drugs**, v. 71, n. 15, p. 2031–2065, 2011.
- HEY, J. A., *et al.* Clinical Pharmacokinetics and Safety of ALZ-801, a Novel Prodrug of Tramiprosate in Development for the Treatment of Alzheimer's Disease. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 57, n. 3, p. 315–333, 2017.
- HEY, J., *et al.* Single dose administration of the b-secretase inhibitor CTS21166 (ASP1720) reduces plasma A β 40 in human subjects. Presented by Dr Koelsch in the International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD), Chicago, IL, USA, 26–31 July 2008. Available at: <http://www.alzforum.org/new/detail.asp?id=1790>.
- HILLMANN, P., *et al.* Ammonium-induced calcium mobilization in 1321N1 astrocytoma cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 227, p. 36–47, 2008.
- HIRSCH, E. C.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?. **Lancet Neurol.**, v. 8, n. 4, p. 382–397, 2009.
- HOLTZMAN, D. M.; MORRIS, J. C.; GOATE, A. M. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. **Sci. Transl. Med.**, v. 3, n. 77., p. 77, 2011.
- HONG-QI, Y.; ZHI-KUN, S.; SHENG-DI, C. Current advances in the treatment of Alzheimer's disease: focused on considerations targeting A β and tau. **Transl. Neurodegener.**, v.1, n. 1, p. 21, 2012.
- HONIG, L. S., *et al.* Trial of Solanezumab for mild dementia due to Alzheimer's disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 378, n. 4, p. 321-30, 2018.
- HOU, T. J.; XU, X. J. ADME evaluation in drug discovery. 3. Modeling blood-brain barrier partitioning using simple molecular descriptors. **J. Chem. Inf, Comput. Sci.**, v. 43, p. 2137-2152, 2003.

- HUANG, Y.; MUCKE, L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. **Cell.**, v. 148, n. 6, p. 1204–1222, 2012.
- HUIMIN, Y., *et al.* Neuroprotection against Ab25–35-induced apoptosis by *Salvia miltiorrhiza* extract in SH-SY5Y cells. **Neurochemistry International**, v. 75, p. 89–95, 2014.
- IGNASIK, M., *et al.* Desing, synthesis and evaluation of novel 2-(aminoalkyl)-isoindoline-1,3-dione derivatives as dual-binding site acetylcholinesterase inhibitors. **Arch Pharm (weinheim)**, v. 345, n. 7, p. 509-16, 2012.
- INESTROSA, N. C., *et al.* Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid- β -peptides into Alzheimer's fibrils: Possible role of the peripheral site of the enzyme. **Neuron**, v. 16, p. 881–891, 1996.
- JACK JR, C. R., *et al.* NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 14, p. 535-562, 2018.
- JACK, C. R., *et al.* Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *The Lancet Neurology*, v. 9, n. 1, p. 119–128, 2010.
- JACOBSEN, H., *et al.* Combined Treatment with a BACE Inhibitor and Anti-A Antibody Gantenerumab Enhances Amyloid Reduction in APPLondon Mice. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 35, p. 11621–11630, 2014.
- JADHAV, S., *et al.* A walk through tau therapeutic strategies. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 7, n. 22, 2019.
- JAYAKUMAR, A. R., *et al.* Oxidative Stress and Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation Mediate Ammonia-Induced Cell Swelling and Glutamate Uptake Inhibition in Cultured Astrocytes. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 18, p. 4774-4784, 2006.
- JI, K.; AKGUL, G., WOLLMUTH, L.P.; TSIRKA, S.E. Microglia actively regulate the number of functional synapses. **PLoS ONE**, v. 8, p. 56293, 2013.
- JOANNA, A. C. *et al.* *elegans* as a model in developmental neurotoxicology. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 354, p.126-135, 2018
- KAIDE, S., *et al.* Conversion of iodine to fluorine-18 based on iodinated chalcone and evaluation for β -amyloid PET imaging. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 12, p. 3352–3358, 2018.
- KALTSCHMIDT, B.; KALTSCHMIDT, C. NF- κ B in the Nervous System. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.**, v. 1, n. 3, p.a001271, 2009.

- KARUNAWEERA, N., *et al.* Plant polyphenols as inhibitors of NF- κ B induced cytokine production—a potential anti-inflammatory treatment for Alzheimer's disease?. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 8, n. 24, 2015.
- KAUSAR, S.; WANG, F.; CUI, H. The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Generation and Its Implications for Neurodegenerative Diseases. **Cells**, v. 7, n. 12, p. 274, 2018.
- KELDER, J. *et al.* Polar molecular surface area as a dominating determinant for oral absorption and brain permeation of drugs. **Pharm. Res.**, v. 16, p. 1514–1519, 1999.
- KEOWKASE, R.; ABOUKHATWA, M.; LUO, Y. Fluoxetine protects against amyloid-beta toxicity, in part via daf-16 mediated cell signaling pathway, in *Caenorhabditis elegans*. **Neuropharmacology**, v. 59, n. 4-5, p. 358–365, 2010.
- KESSING, L. V.; HARHOFF, M.; ANDERSEN, P. K. Treatment with antidepressants in patients with dementia – a nationwide register-based study. **International Psychogeriatrics**, v. 19, n. 5, p. 902, 2006.
- KETTENMANN, H., *et al.* Physiology of microglia. **Physiol. Rev.**, v. 91, p. 461–553, 2011.
- KLEINKAUF-ROCHA J. *et al.* Lipoic acid increases glutamate uptake, glutamine synthetase activity and glutathione content in C6 astrocyte cell line. **Int J Dev Neurosci.**, v. 31, n. 3, p. 165-70, 2013.
- KOCIS, P., *et al.* Elucidating the A β 42 Anti-Aggregation Mechanism of Action of Tramiprosate in Alzheimer's Disease: Integrating Molecular Analytical Methods, Pharmacokinetic and Clinical Data. **CNS Drugs**, v. 31, n. 6, p. 495–509, 2017.
- KOLA, I., LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, p. 711-715, 2004.
- KOROLEV, I. Alzheimer's disease: a clinical and basic science review. **Medical Student Research Journal**, v. 4, p. 24-33, 2014.
- KOZLOV, S., *et al.* Alzheimer's disease: as it was in the beginning. **Reviews in the Neurosciences**, v. 28, n. 8, 2017.

- KRITIS, A. A., *et al.* Researching glutamate – induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. **Cell. Neurosci.**, v. 9, p. 91, 2015.
- KUKULL, W. A., *et al.* Dementia and Alzheimer disease incidence: a prospective cohort study. **Archives of Neurology**, v. 59, n. 11, p. 1737–1746, 2002.
- KWAK, J., *et al.* The chalcone derivative Chana 1 protects against amyloid β peptide-induced oxidative stress and cognitive impairment. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 30, n. 1, p. 193-8, 2012.
- LAI, T. W.; ZHANG, S.; WANG, Y. T. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. **Prog. Neurobiol.**, v. 115, p. 157–188, 2014.
- LECLERC, B.; ABULROB, A. Perspectives in molecular imaging using staging biomarkers and immunotherapies in Alzheimer's disease. **Scientific. World Journal**, v. 2013, 2013.
- LEE, B. I., *et al.* Shedding Light on Alzheimer's β -Amyloidosis: Photosensitized Methylene Blue Inhibits Self-Assembly of β -Amyloid Peptides and Disintegrates Their Aggregates. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- LEE, D., *et al.* A guanidine-appended scyllo-inositol derivative AAD-66 enhances brain delivery and ameliorates Alzheimer's phenotypes. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- LEITE, M. C., *et al.* Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. **Brain Res. Bull.**, v. 70, p. 179–185, 2006.
- LEO, A. J. Calculating log P(Oct) from structures. **Chem. Rev.**, v. 93, p. 1281-1306, 1993.
- LESNÉ, S. E., *et al.* Brain amyloid-b oligomers in ageing and Alzheimers's Disease. **Brain**, v. 136, n. 5, p. 1383-98, 2013.
- LEUZY, A., *et al.* In vivo Detection of Alzheimer's Disease. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 91, n. 3, p. 291-300, 2018.
- LI, B., *et al.* Design, Synthesis and Evaluation of Hesperetin Derivatives as Potential Multifunctional Anti-Alzheimer Agents. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1067, 2017.
- LIU, C. C., *et al.* Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. **Nat Rev Neurol.**, v. 9, p. 106-18, 2013.
- LIU, G., *et al.* Circulating vitamin E levels and Alzheimer's disease: a Mendelian randomization study. **Neurobiology of Aging**, v. 72, p. 1-189, 2018.

- LIU, H. R., *et al.* Novel Potent and Selective Acetylcholinesterase Inhibitors as Potential Drugs for the Treatment of Alzheimer's Disease: Synthesis, Pharmacological Evaluation, and Molecular Modeling of Amino-Alkyl-Substituted Fluoro-Chalcones Derivatives. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 86, n. 4, p. 517–522, 2015.
- LIU, Q. F., *et al.* In Vivo Screening of Traditional Medicinal Plants for Neuroprotective Activity against A β 42 Cytotoxicity by Using Drosophila Models of Alzheimer's Disease. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 38, p. 1891–1901, 2015.
- LOBO, V., *et al.* Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118-26, 2010.
- LOPES, F. M., *et al.* Evaluation of the neurotoxic/neuroprotective role of organoselenides using differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cell line challenged with 6-hydroxydopamine. **Neurotox Res.**, v. 22, n. 2, p. 138-49, 2012.
- LOSCHER, W.; POTSCHKA, H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. **NeuroRx**, v. 2, p. 86-98, 2005.
- LU, M. H., *et al.* The Mitochondrion: A Potential Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. **Neuroscience Bulletin**, v. 34., n. 6, p. 1127–1130, 2018.
- MA, K.; TOMASON, L. A.; MCLAURIN, J. Scyllo-Inositol, preclinical, and clinical data for Alzheimer's disease. **Adv. Pharmacol.**, v. 64, p. 177–212, 2012.
- MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Chalcone Derivatives: Anti-inflammatory Potential and Molecular Targets Perspectives. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 17, n. 28, p. 3146-3169, 2017.
- MANGOURA, D. *et al.* Early and late passage C-6 glial cell growth: similarities with primary glial cells in culture. **Neurochem Res.**, v. 14, n.10, p. 941-7, 1989.
- MARAGAKIS, N. J.; ROTHSTEIN, J. D. Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat. Clin. Pract. Neurol.*, v. 2, p. 679–689, 2006.
- MASSOUD, F.; GAUTHIER, S. Update on the pharmacological treatment of Alzheimer's disease. **Current neuropharmacology**, v. 8, n. 1, p. 69-80, 2010.
- MASTERS, C. L., *et al.* Alzheimer's disease. **Nature reviews. Disease primers**, v. 1, p. 15056, 2015.

- MATÉS, J. M., *et al.* Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 34, n.5, p. 439–458, 2002.
- MCKHANN, G. M., *et al.* The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement.**, v. 7, n. 3, p. 263–9, 2011.
- MCKHANN, G., *et al.* Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. **Neurology**, v. 34, p. 939–44, 1984.
- MCLAURIN, J. *et al.* Cyclohexanehexol inhibitors of Abeta aggregation prevent and reverse Alzheimer phenotype in a mouse model. **Nat. Med.**, v. 12, p. 801–808, 2006.
- MEILANDT, W. J., *et al.* Neprilysin overexpression inhibits plaque formation but fails to reduce protein transgenic mice. **Journal of neuroscience**, v. 29, n. 7, p. 1977-86, 2009.
- MIELCKE, T. R. *et al.* Activity of novel quinoxaline-derived chalcones on in vitro glioma cell proliferation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 255–264, 2012.
- MIKULCA, J. A., *et al.* Potential novel targets for Alzheimer pharmacotherapy: II. Update on secretase inhibitors and related approaches. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 39, n. 1, p. 25–37, 2013.
- MITEW, S., *et al.* Focal demyelination in Alzheimer's disease and transgenic mouse models. **Acta Neuropathol. (Berl)**, v. 119, n. 5, p. 567–577, 2010.
- MO, J. J., *et al.* Efficacy and safety of anti-amyloid- β immunotherapy for Alzheimer's disease: a systematic review and network meta-analysis. **Ann. Clin. Transl. Neurol.**, v. 4, n. 12, p. 931-42, 2017.
- MOLINO, I., *et al.* Efficacy of Memantine, Donepezil, or Their Association in Moderate-Severe Alzheimer's Disease: A Review of Clinical Trials. **The Scientific World Journal**, p. 1–8, 2013.
- MONFORT, P., *et al.* Effects of hyperammonemia and liver failure on glutamatergic neurotransmission. **Metab. Brain Dis.**, v. 17, p. 237–250, 2002.

- MORENO, L. C. G., *et al.* Effect of the oral administration of nanoencapsulated quercetin on a mouse model of Alzheimer's disease. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 517, n. 1-2, p. 50–57, 2017.
- MUSTAFA, I. H., *et al.* Effect of cholineacetyltransferase activity and choline recycle ratio on diffusion-reaction modeling, bifurcation and chaotic behavior of acetylcholine neurocycle and their relation to Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Chemical Engineering Science**, v. 68, n. 1, p. 19–35, 2012.
- NABAVI, S. F., *et al.* Apigenin as neuroprotective agent: Of mice and men. **Pharmacol. Res.**, v. 128, p. 359-365, 2018.
- NAGELE, R. G., *et al.* Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. **Brain Res.**, v. 971, n. 2, p. 197–209, 2003.
- NAJAFIAN, M., *et al.* Core structure of flavonoids precursor as an antihyperglycemic and antihyperlipidemic agent: an in vivo study in rats. **Acta Biochim Pol.**, v. 57, p. 553-560, 2010.
- NORINDER, U.; HAEBERLEIN, M. Computational approaches to the prediction of the blood-brain distribution. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 54, n. 3, p. 291-313, 2002.
- NOVAK, P., *et al.* AADvac1, an Active Immunotherapy for Alzheimer's Disease and Non Alzheimer Tauopathies: An Overview of Preclinical and Clinical Development. **The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease**, v. 6, n. 1, p 63-69, 2019.
- OLNEY, J. W. Excitotoxicity: An Overview. **Canada Diseases Weekly Report**, v. 16, p. 47-57, 1990.
- ONO, M. Molecular imaging of beta-amyloid plaques in the brain. **Brain Nerve.**, v. 59, n. 3, p. 233-40, 2007b
- ONO, M. Structure–activity relationship of chalcones and related derivatives as ligands for detecting of β -amyloid plaques in the brain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 19, p. 6388–6396, 2007c.
- ONO, M., *et al.* Novel chalcones as probes for in vivo imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's brains. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 21, p. 6802–6809, 2007a.

- ORRE M., *et al.* Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. **Neurobiol Aging**, v. 35, n. 12, p. 2746–2760, 2014.
- PAJOUHESH, H.; LENZ, G. R. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. **NeuroRx**, v. 2, p. 541-553, 2005.
- PAN, Y., *et al.* The Synthesis of a Novel Chalcone and Evaluation for Anti-free Radical Activity and Antagonizing the Learning Impairments in Alzheimer's Model. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 949–958, 2012.
- PARDRIDGE, W. M. Crossing the blood-brain barrier: are we getting it right?. **Drug Discov. Today**, v. 6, p. 1-2, 2001.
- PARDRIDGE, W. M. Drug transport across the blood-brain barrier. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 32, p. 1959-1972, 2012.
- PARKER, K.K. *et al.* "Transdifferentiation" of C6 glial cells in culture. **Science**. v. 208, n. 4440, p.179-81, 1980.
- PARKHURST, C. N., *et al.* Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. **Cell**, v. 155, p. 1596–609, 2013.
- PARSONS, C. G.; STÖFFLER, A.; DANYSZ, W. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system - too little activation is bad, too much is even worse. **Neuropharmacology**, v. 53, n. 6, p. 699–723, 2007.
- PATTERSON, C. World Alzheimer Report 2018: The state of the art of dementia research: New frontiers. **Alzheimer's Disease International (ADI)**, 2018.
- PAULA-LIMA, A. C., *et al.* Amyloid beta-peptide oligomers stimulate RyR-Mediated Ca²⁺ release inducing mitochondrial Fragmentation in hippocampal neurons and prevent RyR-mediated dendritic spine Remodeling produced by BDNF. **Antioxidants & Redox signaling**, v. 14. n. 7, p. 1209-1223, 2011.
- PEREA, G.; SUR, M.; ARAQUE, A. Neuron-glia networks: integral gear of brain function. **Front Cell Neurosci.**, v. 8, n. 378, 2014.
- PERL, D. P. Neuropathology of Alzheimer's disease. **Mt Sinai J Med.**, v. 77, n. 1, p. 32-42, 2010.
- PEROPADRE, A. *et al.* Cellular responses associated with dibucaine-induced phospholipidosis. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, n. 2, p. 185–192, 2011.

- PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11-26, 2014.
- PIANI, D; FONTANA, A. Involvement of the cystine transport system x_c^- in the macrophage-induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. **J Immunol.**, v. 152, p. 3578–3585, 1994.
- PILATOVA, M., *et al.* In vitro antiproliferative and antiangiogenic effects of synthetic chalcone analogues. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 5, p. 1347–1355, 2010.
- QU, X., *et al.* Metal-Organic Frameworks Harness Cu Chelating and Photooxidation Against Amyloid β Aggregation in vivo. **Chemistry - A European Journal**. 2019. doi:10.1002/chem.201805835
- QUIGNOT, N. Modeling bioavailability to organs protected by biological barriers. **In silico Pharmacol.**, v.1, n. 8, 2013.
- QUINCOZES-SANTOS, A., *et al.* **Actions of redox-active compound resveratrol under hydrogen peroxide insult in C6 astroglial cells. Toxicol. In Vitro**, v. 24, p. 916-920, 2010.
- QUINCOZES-SANTOS, A., *et al.* The janus face of resveratrol in astroglial cells. **Neurotox Res.**, v.16, p. 30-41, 2009.
- RAMKUMAR, M., *et al.* Neuroprotective effect of Demethoxycurcumin, a natural derivative of Curcumin on rotenone induced neurotoxicity in SH-SY 5Y Neuroblastoma cells. **BMC Complement Altern Med.**, v. 17, n. 1, p. 127, 2017.
- RAMPA, A., *et al.* Exploiting the Chalcone Scaffold to Develop Multifunctional Agents for Alzheimer's Disease. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1902, 2018.
- RAMPA, A., *et al.* Chalcone-based carbamates for Alzheimer's disease treatment. **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 8, p.749–764, 2017.
- RAMPA, A., *et al.* Naturally Inspired Molecules as Multifunctional Agents for Alzheimer's Disease Treatment. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 643, 2016.
- RANSOM, B.R.; RANSOM, C.B. Astrocytes: multitalented stars of the central nervous system. **Methods Mol. Biol.**, v. 814, p. 3–7, 2012.
- RAO, Y. K.; TZENG, Y. Differential effects of synthesized 2^o-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2679-2686, 2004.

- REGE, S. D., *et al.* Resveratrol protects β amyloid-induced oxidative damage and memory associated proteins in H19-7 hippocampal neuronal cells. **Curr. Alzheimer Res.**, v. 12, p. 147, 2015.
- RIES, M.; SASTRE, M. Mechanisms of A β clearance and degradation by glial cells. **Front Aging Neurosci.**, v. 8, p. 160, 2016.
- ROSENBERG, P. B., *et al.* Changes in Neuropsychiatric Inventory Associated with Semagacestat Treatment of Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 54, n. 1, p. 373–381, 2016.
- SAKONO, M.; ZAKO, T. Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. **The FEBS journal**, v. 277, p. 1348-1358, 2010.
- SALLOWAY, S., *et al.* Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 370, n. 4, p. 322-33, 2014.
- SASHIDHARA, K. V., *et al.* Benzofuran-Chalcone Hybrids as Potential Multifunctional Agents against Alzheimer's Disease: Synthesis and in vivo Studies with Transgenic *Caenorhabditis elegans*. **Chem. Med. Chem.**, v. 9, n. 12, p. 2671–2684, 2014.
- SCHARF, A., *et al.* Anti-amyloid compounds protect from silica nanoparticle-induced neurotoxicity in the nematode *C. elegans*. **Nanotoxicology**, v. 10, n. 4, p. 426-35, 2015.
- SCHELTENS, P., *et al.* Alzheimer's disease. **The lancet**, v. 388, n. 10043, p. 505-517, 2016.
- SCHENK, D., *et al.* Immunization with amyloidbeta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. **Nature**, v. 400, p. 173–177, 1999.
- SCHILLING, L. P. Imaging Alzheimer's disease pathophysiology with PET. **Dement. neuropsychol.**, v. 10, n. 2, 2016.
- SCHINKEL, A. H. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the bloodbrain barrier. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 36, p. 179-194, 1999.
- SCIMEMI, A., *et al.* Amyloid- β 1-42 slows clearance of synaptically released glutamate by mislocalizing astrocytic GLT-1. **J. Neurosci. Off J. Soc. Neurosci.**, v. 33, n. 12, p. 5312–5318, 2013.
- SEBOLLELA, A., *et al.* Amyloid-oligomers induce differential genes expression in adult human brain slice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 10, p. 7436-7445, 2012.

- SEBOLLELA, A., *et al.* Elucidating molecular mass and shape of a neurotoxic Ab oligomer. **ACS chemical neuroscience**, v. 5, n. 12, p. 1238-45, 2014.
- SENSI, S. L., *et al.* Copper and Zinc Dysregulation in Alzheimer's Disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 39, n. 12, p. 1049-1063, 2018.
- SHAH, M. S., *et al.* Cholinesterases inhibition and molecular modeling studies of piperidyl-thienyl and 2-pyrazoline derivatives of chalcones. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 4, p. 615–624, 2017.
- SIEMERS, E., *et al.* Safety, tolerability, and changes in amyloid beta concentrations after administration of a gamma-secretase inhibitor in volunteers. **Clin. Neuropharmacol.**, v. 28, n. 3, p. 126-32, 2005.
- SILVA, L. F. A. **Estudo bioético sobre familiares que cuidam de pessoas idosas com doenças neurodegenerativas.** 130f. 2017. Tese (Doutorado em Bioética) - Universidade de Brasília, Brasília, Goiás. 2017.
- SIMÕES, C.M.O., *et al.* **Farmacognosia, da planta ao medicamento.** Porto Alegre: editora UFRGS, 2007. 1104p.
- SINKE, A. P., *et al.* NFκB in the Mechanism of Ammonia-Induced Astrocyte Swelling in Culture. **J Neurochem.**, v. 106, n. 6, p. 2302–2311, 2008.
- SMITH, R. A. Twenty-first century challenges for in vitro neurotoxicity. **Altern. Lab. Anim.**, v. 37, n. 4, p. 367-75, 2009.
- SÖKMEN, M.; KHAN, M. A. The antioxidant activity of some curcuminoids and chalcones. **Inflammopharmacology**, v. 24, n. 2-3, p. 81–86, 2016.
- SOLITO, E.; SASTRE, M. Microglia Function in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Pharmacology.**, v. 3, n. 14, 2012.
- SOMJEN, G. G. Nervenkitz: Notes on the History of the Concept of Neuroglia. **GLIA**, v. 1, p. 2-9, 1988.
- SPAGNUOLO, C.; MOCCIA, S.; RUSSO, G. L. Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 153, p. 105-115, 2018.
- SPENCER, B.; MASLIAH, E. Immunotherapy for Alzheimer's disease: past, present and future. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 6, n. 114, 2014.
- SPERLING, R. A., *et al.* Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging Alzheimer's

- Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement.**, v. 7, n. 3, p. 280–292, 2011.
- STANSLEY, B.; POST, J.; HENSLEY, K. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. **J Neuroinflammation.**, v. 31, n. 9, p. 115. 2012.
- SUN, P., *et al.* Neuroprotective Effects of Geniposide in SH-SY5Y Cells and Primary Hippocampal Neurons Exposed to A β 42. **BioMed Research International**, p. 11, 2014.
- TAGAMI, S., *et al.* Semagacestat Is a Pseudo-Inhibitor of γ -Secretase. **Cell Reports**, v. 21, n. 1, p. 259–273, 2017.
- THÉRIAULT, P., ELALI, A.; RIVEST, S. The dynamics of monocytes and microglia in Alzheimer's disease. **Alzheimers Res. Ther.**, v. 7, n. 1, p. 41, 2015.
- THOMAS, P.; FENECH, M. A review of genome mutation and Alzheimer's disease. **Mutagenesis**, v. 22, n. 1, p. 15-33, 2007.
- TRAMUTOLA, A., *et al.* Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. **Brain Research Bulletin**, v. 133, p. 88–96, 2017.
- TRIPPIER, P. C. Selecting Good 'Drug-Like' Properties to Optimize Small Molecule Blood-Brain Barrier Penetration. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 1392-1407, 2016.
- TSAI, C. W. *et al.* Neuroprotective Effects of Betulin in Pharmacological and Transgenic *Caenorhabditis elegans* Models of Parkinson's Disease. **Cell transplantation**, v. 26, v. 12 p. 1903-1918, 2018.
- TSAI, R. Y. L. In vitro neurotoxicology: principles and challenges. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 40, n. 7, p. 242, 2004.
- UNZETA, M., *et al.* Multi-target directed donepezil-like ligands for Alzheimer's disease. **Front. Neurosci.**, v. 10, p. 205, 2016.
- VAN MARUM, R. J. Update on the use of memantine in Alzheimer's disease. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 5, p. 237-47, 2009.
- VANDENBERGHE, R., *et al.* Bapineuzumab for mild to moderate Alzheimer's disease in two global, randomized, phase 3 trials. **Alzheimer's Res Ther.**, v. 8, n. 1, p. 18, 2016.

- VASTAG, M.; KESERU, G.M. Current in vitro and in silico models of blood-brain barrier penetration: a practical view. **Curr. Opin Drug. Discov. Devel.**, v. 12, p. 115-124, 2009.
- VELLAS, B., *et al.* EHT0202 in Alzheimer's disease: a 3-month, randomized, placebo-controlled, double-blind study. **Curr. Alzheimer Res.**, v. 8, n. 2, p. 203-12, 2012.
- VERGHESE, P. B.; CASTELLANO, J. M.; HOLTZMAN, D. M. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. **Lancet Neurol.**, v. 10, p. 241-52, 2011.
- VERKHRATSKY, A., *et al.* Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion. **EMBO J.**, v. 35, p. 239-257, 2016.
- VILLEDA, S. A., *et al.* The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. **Nature**, v. 477, n. 7362, p. 90–94, 2011.
- VILLEMAGNE, V. L., *et al.* Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 4, p. 357–367, 2013.
- VINCENT, A. J., *et al.* Astrocytes in Alzheimer's disease: emerging roles in calcium dysregulation and synaptic plasticity. **J. Alzheimers Dis.**, v. 22, n. 3, p. 699–714, 2010.
- VISAN, A., *et al.* Neural differentiation of mouse embryonic stem cells as a tool to assess developmental neurotoxicity in vitro. **NeuroToxicology**, v. 33, n. 5, p. 1135–1146, 2012.
- WAGER, T. T., *et al.* Defining desirable central nervous system drug space through the alignment of molecular properties, in vitro ADME, and safety attributes. **ACS Chem. Neurosci.**, v. 1, p. 420-434, 2010.
- WANG, M., *et al.* Synthesis and biological evaluation of new tetramethylpyrazine-based chalcone derivatives as potential anti-Alzheimer agents. **Chemical Biology & Drug Design.**, v. 92, n. 5, p. 1859-1866, 2018.
- WANG, R.; REDDY, P. H. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 57, n. 4, p. 1041-1048, 2017.
- WANG, S.; COLONNA, M. Microglia in Alzheimer's disease: A target for immunotherapy. **J. Leukoc. Biol.** 2019

- WANG, Y.; QIN, Z. H. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. **Apoptosis**, v. 15, p. 1382–1402, 2010.
- WEST, M., *et al.* Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. **Lancet.**, v. 344, n. 8925, p. 769–72, 1994.
- WHO (World Health Organization). Dementia: a public health priority. Geneva: WHO; 2012.
- WILKINSON, K.; EL KHOURY, J. Microglial scavenger receptors and their roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Int. J. Alzheimer's Dis.**, v. 2012, 2012.
- WINBLAD, B., *et al.*, Active immunotherapy options for Alzheimer's disease. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 6, p. 7, 2014.
- WISCHIK, C. M., *et al.* Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 11213–11218, 1996.
- WYSS-CORAY, T., *et al.* Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. **Nat Med.**, v. 9, n. 4, p. 453–457, 2009.
- XIAO, G., *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of 4'-aminochalcone-rivastigmine hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 1030–1041, 2017.
- XIE, L., *et al.* Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain. **Science**, v. 342, n. 6156, p. 373–377, 2013.
- YADAV, V. R., *et al.* The role of chalcones in suppression of NF-κB-mediated inflammation and cancer. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 3, p. 295–309, 2011.
- YIANNOPOULOU, K. G.; PAPAGEORGIOU, S. G. Current and future treatments for Alzheimer's disease. **Ther. Adv. Neurol. Disord.**, v. 6, n. 1, p. 19-33, 2013.
- YONG-KEE, C. J.; SALOMONCZYK, D.; NASH, J. E. Development and validation of a screening assay for the evaluation of putative neuroprotective agents in the treatment of Parkinson's disease. **Neurotox Res.**, v. 19, n. 4, p. 519-26, 2011.
- YOUNG, J. Z. The Concept of Neuroglia. **Glial-Neuronal Interaction**, v. 633, p. 1–18, 1991.

-
- ZHANG, C., *et al.* A new approach for Alzheimer's disease treatment through P-gp regulation via ibuprofen. **Pathology - Research and Practice**, v. 214, n. 11, p. 1765-1771, 2018.
- ZHANG, W., *et al.* Preparation of Tetradentate Copper Chelators as Potential Anti-Alzheimer Agents. **Chem. Med. Chem.**, v. 13, n. 7, p. 684–704, 2018.
- ZHANG, Y., *et al.* Targeting myeloid differentiation protein 2 by the new chalcone L2H21 protects LPS-induced acute lung injury. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 21, n. 4, p. 746-757, 2017.
- ZHAO, L., *et al.* Apigenin attenuates copper-mediated beta- amyloid neurotoxicity through antioxidation, mitochondrion protection and MAPK signal inactivation in an AD cell model. **Brain Res.**, v. 1492, p. 33-45, 2013.
- ZHAO, W. Q., *et al.* Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. **The FASEB journal**, v. 22, n. 1, p. 246-260, 2007.
- ZHAO, X., *et al.* Genistein Inhibited Amyloid- β induce inflammatory damage in C6 glial cells. **Archives of Medical Research**, v. 45, p. 152-157, 2014.
- ZIMMER, E. R., *et al.* MicroPET imaging and transgenic models: a blueprint for Alzheimer's disease clinical research. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 11, p. 629–641, 2014.
- ZURICH, M. G., *et al.* Evaluation of aggregating brain cell cultures for the detection of acute organ-specific toxicity. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 4, p. 1416–1424, 2013.