



24º SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

13ª Mostra Científica de Integração
entre Pós-Graduação e Graduação
3ª Jornada de Tecnologia e Inovação

AVALIAÇÃO IN SILICO E IN VIVO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DO PLUMIERÍDEO EM MODELO EXPERIMENTAL DE ALZHEIMER INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA EM CAMUNDONGOS

Graziella Martins Guimarães, Ana Caroline dos Santos, Martina Harle, Joanna Sievers, Heloisa Immianovsky Eisendecker, Camila Cazarin, Ana Paula Dalmagro, Angela Malheiros, Marcia Maria de Souza
Farmacologia - Neuropsicofarmacologia

A Doença de Alzheimer (DA) é uma condição neurodegenerativa progressiva caracterizada por declínio cognitivo, perda de memória, alterações de comportamento e comprometimento funcional. É a principal causa de demência em idosos, afetando aproximadamente 10% da população com idade superior a 65 anos. As projeções da Organização Mundial da Saúde indicam que até 2050 cerca de 132 milhões de indivíduos poderão ser afetados, configurando um grave problema de saúde pública, com impacto social e econômico significativo. Os tratamentos atualmente disponíveis, como inibidores da acetilcolinesterase e antagonistas de receptores NMDA, têm eficácia limitada, atuando apenas de forma sintomática e sem modificar a progressão da doença. Dessa forma, há crescente interesse em compostos multialvo, capazes de modular simultaneamente diferentes vias patológicas, incluindo degradação colinérgica, metabolismo de monoaminas, fosforilação de proteína tau e agregação de beta-amiloide. Iridoides naturais, como o plumierídeo (PLU), têm demonstrado efeitos neuroprotetores, anti-inflamatórios e antioxidantes, com potencial de melhorar déficits cognitivos e comportamentais em modelos animais. Este estudo avaliou a capacidade do PLU em reverter alterações cognitivas e comportamentais induzidas por estreptozotocina (STZ) em camundongos, bem como sua afinidade e interações moleculares com proteínas chave na DA por docking. Os resultados comportamentais mostraram melhora significativa na memória de reconhecimento, memória espacial, memória aversiva, redução da ansiedade e efeito antidepressivo. As análises de docking demonstraram afinidade relevante do PLU com AChE, BChE, MAO-B, GSK-3β, β-secretase e receptor D2, sugerindo mecanismo de ação multialvo consistente com os efeitos observados in vivo. Esses achados indicam o PLU como candidata promissora para futuras intervenções terapêuticas na DA.

Introdução

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva caracterizada pela morte neuronal e alterações sinápticas, resultando em prejuízo cognitivo, declínio da memória, desorientação, comprometimento da linguagem e déficits visuoespaciais. Entre os mecanismos envolvidos, destacam-se a disfunção das vias colinérgicas e dopamínergicas, aumento do estresse oxidativo, inflamação neurogênica e acúmulo de placas de beta-amiloide e emaranhados neurofibrilares de proteína tau. A degradação da acetilcolina mediada pela AChE e BChE contribui para o déficit cognitivo, enquanto a MAO-B degrada dopamina e aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio. A GSK-3β participa da fosforilação da proteína tau, promovendo a formação de emaranhados neurofibrilares, e a β-secretase atua na clivagem do precursor amiloide, aumentando o acúmulo de placas beta-amiloïdes. Alterações comportamentais, incluindo depressão, ansiedade e apatia, frequentemente antecedem o comprometimento cognitivo, interferindo na qualidade de vida.

A epidemiologia da DA revela que o envelhecimento populacional é o principal fator de risco, sendo que a presença de predisposição genética, resistência à insulina cerebral, hipertensão, diabetes tipo 2 e exposição a estresse oxidativo também contribuem para o desenvolvimento da doença. Além disso, o impacto social da DA é considerável, com aumento da dependência de cuidadores, sobrecarga familiar e custos significativos ao sistema de saúde. Por outro lado, pesquisas recentes têm evidenciado que compostos naturais com ação multialvo podem modular simultaneamente várias vias patológicas, proporcionando efeito neuroprotector mais amplo. Iridoides, incluindo o PLU, demonstraram capacidade antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora, revertendo déficits comportamentais em modelos animais. Estudos prévios sugerem que a ação do PLU está associada à modulação de neurotransmissores, proteção contra morte neuronal e redução de comportamento ansioso e depressivo.

Diante desse contexto, o objetivo do presente estudo é investigar a eficácia do PLU na reversão de déficits cognitivos e comportamentais induzidos por STZ em camundongos, assim como analisar sua



24º SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

13º Mostra Científica de Integração
entre Pós-Graduação e Graduação
3º Jornada de Tecnologia e Inovação

afinidade e interações moleculares com proteínas-chave da DA por docking, contribuindo para o desenvolvimento de potenciais terapias multialvo.

Método

Todos os procedimentos seguiram rigorosamente as normas e diretrizes do Comitê de Ética no Uso de Animais sob nº 003_24 da Universidade do Vale do Itajaí (CEUA/Univali). Primeiramente, a indução da Doença de Alzheimer em camundongos foi realizada por meio de injeção intracerebroventricular de estreptozotocina (STZ), conforme descrito por Pinton et al. (2010) e adaptado em nossos laboratórios por Berté et al. (2018). Inicialmente, os animais foram anestesiados com solução de ketamina (90 mg/kg, intraperitoneal) e xilazina (10 mg/kg, intraperitoneal) até a completa perda dos reflexos posturais e analgesia. Em seguida, foi aplicada anestesia local com lidocaína 2% contendo epinefrina (Xylestesin® 2%) na região superior da cabeça, prevenindo sangramentos durante a exposição do crânio. A solução de STZ (2,5 mg/mL) foi infundida em volume total de 3,0 µL no ventrículo cerebral através de bomba de infusão INSIGHT®, utilizando agulha hipodérmica de 1 mm acoplada a seringa Hamilton de 5 µL, em 30 segundos, com referência ao ponto bregma e lateralização alternada entre os hemisférios direito e esquerdo nas duas infusões realizadas com intervalo de 48 horas.

Após cada procedimento, os animais foram mantidos em caixa pós-cirúrgica sob iluminação até recuperação completa dos movimentos, sendo também monitorados nas 48h seguintes. Depois disso, seguiu-se o período de tratamento, sendo os animais separados em 6 grupos (G1: recebeu apenas STZ; G2: STZ/veículo; G3: STZ/PLU 0,5 µg/kg; G4: STZ/PLU 5 µg/kg; G5: STZ/PLU 50 µg/kg; G6: STZ/Rivastigmina 500 µg/kg) e tratados por 15 dias consecutivos. No décimo sexto dia após a indução da DA, foi realizado o teste de campo aberto para avaliar atividade locomotora e exploração ambiental, utilizando caixa de madeira de 40x60x50 cm com assoalho dividido em 12 quadrados e parede de vidro para observação, sendo registrados durante seis minutos o número de quadrados atravessados com as quatro patas e a frequência de rearings, o aparato foi limpo com álcool 10% após cada sessão. O teste de reconhecimento de objetos ocorreu em três fases: habituação, amostra e teste, permitindo avaliar memória de reconhecimento com base na preferência natural por objetos novos em comparação com familiares. Durante a fase de habituação os animais exploraram o aparato por 10 minutos, na fase de amostra dois objetos idênticos foram apresentados durante 10 minutos e, na fase de teste, um objeto foi substituído por outro diferente, sendo calculado o índice de reconhecimento como tempo de interação com o objeto novo dividido pelo tempo total de interação com os dois objetos.

A avaliação da memória aversiva foi conduzida pelo teste de esquiva inibitória em caixa automatizada de 50x25x25 cm dotada de plataforma de fórmica. Durante a sessão de treinamento, cada animal foi colocado gentilmente sobre a plataforma e foi cronometrada a latência de descida da mesma, definida como o momento em que todas as quatro patas do animal tocam na grade. Quando isso ocorre, o animal sofreu um choque nas patas de 0,4 mA por um período de 2s, de modo a fazer com que o animal retornasse a plataforma e percebesse que este é um lugar seguro. Imediatamente após a sessão de treino, os animais receberam o tratamento e, após 24h ao treino foi realizada a sessão de teste (retenção), a qual teve o mesmo procedimento do treinamento, exceto pela omissão dos choques, com a latência de descida da plataforma limitada a 180 segundos. A diferença entre as latências de descida da plataforma nas sessões de treino e teste foi considerada como índice de memória.

A memória olfativa foi avaliada pelo teste de alimentação suprimida por novidade, adaptado de Jamain et al. (2008), em que os animais foram previamente habituados à ingestão de biscoitos, submetidos a restrição alimentar de 30% por 15 horas antes do teste e, no ensaio, colocados em caixas com maravilha contendo biscoito escondido, sendo cronometrada a latência para localização do alimento. Parâmetros de comportamento depressivo foram mensurados pelo splash test, aplicando solução de sacarose a 10% na pelagem dorsal, registrando-se latência, frequência e duração do grooming durante seis minutos, iniciando o tratamento 60 minutos antes do teste. A ansiedade foi avaliada no labirinto em cruz elevado, formado por dois braços abertos e dois braços fechados perpendiculares, conectados por plataforma central, sendo observadas a frequência e o tempo gasto nos braços abertos e fechados durante cinco minutos, após 60 minutos da administração dos tratamentos, com limpeza do aparato com álcool 10% entre cada animal. Os procedimentos permitiram avaliar de forma integrada alterações locomotoras, cognitivas, emocionais e ansiosas nos animais submetidos à indução da DA, assegurando padronização e controle ambiental durante todos os testes comportamentais.

Para docking molecular, a estrutura tridimensional do PLU foi construída e otimizada com Avogadro. As proteínas-alvo, incluindo AChE, BChE, MAO-B, GSK-3β, β-secretase e receptor D2, foram obtidas do Protein Data Bank e preparadas no Chimera, removendo moléculas de água e ligantes co-cristalizados. O docking



24º SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

13º Mostra Científica de Integração
entre Pós-Graduação e Graduação
3º Jornada de Tecnologia e Inovação

foi conduzido com AutoDock Vina, e as interações proteína-ligante foram analisadas no Discovery Studio Visualizer, identificando ligações hidrogênio e interações hidrofóbicas relevantes para inibição.

Resultados e Discussões

Os testes comportamentais demonstraram melhora significativa das funções cognitivas e emocionais nos grupos tratados com PLU. No teste de reconhecimento de objetos, os grupos tratados exploraram significativamente mais o objeto novo, indicando preservação da memória de reconhecimento. No campo aberto, houve aumento do índice de reconhecimento e maior exploração do centro da arena, sugerindo redução da ansiedade e melhora da memória espacial. No labirinto em cruz elevado, os grupos tratados apresentaram aumento nas entradas nos braços abertos e redução nos fechados, indicando diminuição significativa da ansiedade. A esquiva inibitória mostrou aumento do tempo para descer da plataforma, refletindo melhora da memória aversiva. No teste de alimentação suprimida pela novidade, observou-se diminuição da latência para localizar o alimento, sugerindo melhora da memória olfativa e motivação alimentar. O splash test demonstrou aumento na frequência e duração do grooming e redução da latência, refletindo efeito antidepressivo consistente. No teste de torções induzidas por ácido acético, o PLU reduziu o número de torções, indicando efeito analgésico. Estes resultados corroboram a literatura recente sobre iridoides, reforçando a capacidade do PLU de modular memória, ansiedade e depressão em modelos animais de DA.

No docking molecular, o PLU apresentou afinidade elevada com todos os alvos: AChE (-10,9 kcal/mol), BChE (-10,1 kcal/mol), MAO-B (-7,7 kcal/mol), GSK-3β (-8,3 kcal/mol), β-secretase (-8,4 kcal/mol) e receptor D2 (-8,0 kcal/mol). As análises estruturais evidenciaram ligações hidrogênio e interações hidrofóbicas estáveis com resíduos catalíticos, sugerindo mecanismo de inibição multialvo robusto. Esses resultados indicam que o PLU pode modular simultaneamente vias colinérgicas, dopamínergicas e processos relacionados à agregação de proteínas, o que se alinha aos efeitos observados nos testes comportamentais. As evidências destacam o potencial terapêutico do PLU e reforçam a importância de estudos *in vivo* integrados com abordagens *in silico* para identificação de candidatos promissores na DA. Limitações incluem ausência de análise farmacocinética e segurança, que devem ser avaliadas em estudos futuros.

Considerações Finais

O PLU demonstra capacidade de reverter déficits cognitivos e comportamentais induzidos por STZ. O composto apresenta afinidade elevada em docking molecular com AChE, BChE, MAO-B, GSK-3β, β-secretase e receptor D2. Os resultados evidenciam ação multialvo consistente com os efeitos observados *in vivo*. O PLU representa candidata promissora para terapias multialvo em DA. Estudos futuros devem investigar segurança, biodisponibilidade e eficácia clínica.

Palavras-chave: Alzheimer; plumierídeo; Allamanda cathartica; docking molecular

Referências

- AMOAH, S. K. S. et al. Inhibitory effect of sesquiterpene lactones and the sesquiterpene alcohol aromadendrane-4β,10α-diol on memory impairment in a mouse model of Alzheimer. *European Journal of Pharmacology*, v. 769, p. 195–202, 2015.
- BALDINOTTI, R. et al. Protective effects of octylseleno-xylofuranoside in a streptozotocin-induced mouse model of Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology*, v. 910, n. 174499, p. 174499, 2021.
- BERTÉ, T. E. et al. Taraxerol as a possible therapeutic agent on memory impairments and Alzheimer's disease: Effects against scopolamine and streptozotocin-induced cognitive dysfunctions. *Steroids*, v. 132, p. 5–11, 2018.
- CAZARIN, C. A. et al. Usnic acid enantiomers restore cognitive deficits and neurochemical alterations induced by Aβ1-42 in mice. *Behavioural Brain Research*, v. 397, p. 112945, 2021.
- HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis



24º SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

13º Mostra Científica de Integração
entre Pós-Graduação e Graduação
3º Jornada de Tecnologia e Inovação

platform. *Journal of Cheminformatics*, v. 4, p. 17, 2012.

JAMAIN, S. et al. Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 5, p. 1710–1715, 2008.

LISTER, R. et al. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse.

Psychopharmacology, v. 92, p. 180–185, 1987.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 14, p. 149–167, 1985.

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

SMIT-RIGTER, L. A. et al. Prenatal fluoxetine exposure induces life-long serotonin 5-HT3 receptor-dependent cortical abnormalities and anxiety-like behaviour.

Neuropharmacology, v. 62, n. 2, p. 865–870, 2012.

Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

Apoio: Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (Fapesc)