

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**Efeito do composto 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(3-(piperidin-1-il)propil)tiazolidin-4-
ona na memória e em parâmetros bioquímicos cerebrais e sistêmicos em um
modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer**

Alessandra dos Santos

Pelotas, 2022

Alessandra dos Santos

Efeito do composto 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(3-(piperidin-1-il)propil)tiazolidin-4-ona na memória e em parâmetros bioquímicos cerebrais e sistêmicos em um modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção.

Orientadora: Prof^a Dr^a Roselia Maria Spanevello

Co-orientadora: Dr^a Fernanda Cardoso Teixeira

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S237e Santos, Alessandra dos

Efeito do composto 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(3-(pipe-idin-1-il)propil)thiazolidin-4-ona na memória e em parâmetros bioquímicos cerebrais e sistêmicos em um modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer / Alessandra dos Santos ; Roselia Maria Spanevello, orientadora ; Fernanda Cardoso Teixeira, coorientadora. — Pelotas, 2022.

71 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Thiazolidin-4-onas. 2. Estresse oxidativo. 3. Cérebro. 4. Doença de Alzheimer. 5. Acetilcolinesterase. I. Spanevello, Roselia Maria, orient. II. Teixeira, Fernanda Cardoso, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

Alessandra dos Santos

Efeito do composto 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(3-(piperidin-1-il)propil)thiazolidin-4-ona na memória e em parâmetros bioquímicos cerebrais e sistêmicos em um modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 24 de março de 2022

Banca examinadora:



Prof^a Dr^a Roselia Maria Spanevello (Orientadora). Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)



Dr. Fabiano Barbosa Carvalho. Doutor em Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)



Prof. Dr. César Augusto Brüning. Doutor em Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Dedico este trabalho especialmente ao meu amado avô, Pedro, e à todas as pessoas que sofrem com a Doença de Alzheimer; e à minha avó, Lenoir, e a todos os cuidadores, que muitas vezes sofrem mais que o próprio paciente.

Vocês são minha luz!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar meu caminho e minhas escolhas, me abençoando nesta caminhada.

À Universidade Federal de Pelotas, por possibilitar a realização deste trabalho, bem como ao laboratório NEUROCAN, por todo aprendizado e experiências adquiridas. Agradeço também aos colegas de laboratório, os quais me auxiliaram em partes do trabalho que eu jamais conseguiria realizar sozinha.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Roselia Maria Spanevello, pela orientação e pela confiança no meu trabalho e no meu potencial. Agradeço por todo carinho, atenção, dedicação e paciência possíveis durante o mestrado, especialmente na realização deste trabalho. Agradeço também à minha co-orientadora, Fernanda, por me introduzir na pesquisa científica sobre Alzheimer e pela ajuda nesta pesquisa.

À Julia, sem a qual seria impossível realizar este trabalho, agradeço pela amizade que construímos, por toda ajuda e dedicação e por sempre me motivar e acreditar em mim. Agradeço também por toda a paciência que teve comigo, me auxiliando na minha formação profissional e pessoal, onde serviu como grande exemplo de competência, integridade e generosidade.

Ao meu avô, obrigada por ser um pai para mim e por todos os ensinamentos ao longo da minha vida. Agradeço especialmente por ser a minha motivação para realização deste trabalho e querer encontrar uma melhor qualidade de vida para o senhor e para os portadores da Doença de Alzheimer, para que possa te ter ao meu lado por muitos anos mais. Te amo.

À minha querida avó, por todo o carinho e cuidado maternal que teve comigo a vida toda, agradeço também por toda a dedicação e cuidado com meu avô nesse período tão difícil, o qual tens enfrentado com todo esmero, paciência e positividade, onde não tens medido esforços em ser o esteio forte da nossa família. Te amo e admiro muito por isso.

Aos meus pais, por me incentivarem a alcançar meus objetivos e sonhos, em especial à minha mãe, por todo o carinho e atenção diários, sempre me motivando e aconselhando nos momentos mais difíceis.

Ao meu tio Gustavo, agradeço por todo o carinho comigo durante minha vida toda, pelo acolhimento nos momentos mais difíceis e por se fazer tão importante na minha formação pessoal, onde foste exemplo de caráter, humildade e dedicação com toda nossa família.

Ao Abraão, meu melhor amigo e namorado, por toda a dedicação, compreensão e carinho durante os últimos dez anos e por estar sempre ao meu lado, me apoiando em cada passo ao longo de toda esta jornada.

Por último, mas de maneira alguma menos importante, gostaria de agradecer a toda minha família, por todo carinho, apoio e motivação. Eu jamais serei capaz de retribuir todo o amor e incentivo que recebi de vocês!

A todos que de alguma forma contribuíram com minha trajetória acadêmica, meus sinceros agradecimentos!

“A felicidade está na jornada, não no destino.”

(Autor desconhecido)

Resumo

SANTOS, Alessandra dos. Efeito do composto 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(3-(piperidin-1-il)propil)tiazolidin-4-ona na memória e em parâmetros bioquímicos cerebrais e sistêmicos em um modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer, 2022. 71f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa caracterizada por um declínio da memória e das funções cognitivas. É a forma mais comum de demência, com caráter progressivo e irreversível, impactando as atividades básicas diárias em pacientes acometidos. A DA tornou-se um grande problema de saúde pública. Dentre os mecanismos neuroquímicos associados a DA estão o estresse oxidativo e uma piora na sinalização mediada pelas sinapses colinérgicas, sendo esta neurotransmissão o principal alvo dos tratamentos disponíveis. Cabe destacar que através do arsenal terapêutico atualmente disponível, é possível apenas aliviar os sintomas desta doença, sendo incapaz de impedir sua progressão. Logo, a busca por novas alternativas terapêuticas capazes de prevenir ou retardar o avanço desta doença torna-se cada vez mais relevante, afim de proporcionar melhor qualidade de vida aos pacientes. As tiazolidin-4-onas são compostos que têm sido alvo de pesquisas por apresentarem atividades farmacológicas destacando efeitos antioxidantes e anticolinesterásicos. Diante disso, o presente estudo investigou os efeitos do composto 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(3-(piperidin-1-il)propil)tiazolidin-4-ona (DS12) na memória e em parâmetros neuroquímicos em um modelo experimental para DA induzido pela injeção intracerebroventricular (ICV) de estreptozotocina (STZ) em ratos. Foram utilizados ratos machos adultos, os quais foram divididos em cinco grupos: I- controle (solução salina); II - DS12 (10 mg/kg); III-STZ, IV-STZ + DS12 (10 mg/kg); V- STZ + donepezil (5 mg/kg). Os tratamentos foram realizados por via oral durante 20 dias. Posteriormente, foram avaliados parâmetros comportamentais relacionados à memória através dos testes de reconhecimento de objetos e labirinto em Y. Após a eutanásia, o córtex cerebral, o hipocampo e o cerebelo foram coletados para avaliar marcadores de estresse oxidativo e a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). Parâmetros bioquímicos e hematológicos foram avaliados em amostras de sangue e soro. Os resultados demonstraram que o comprometimento na memória e o aumento da atividade da AChE induzida pela STZ foram prevenidos pelo tratamento com DS12 e donepezil. A STZ induziu um aumento nas espécies reativas de oxigênio e uma diminuição na atividade da catalase no hipocampo, córtex cerebral e cerebelo. O tratamento com DS12 conferiu proteção frente a essas alterações oxidativas em todas as estruturas cerebrais. Não foram observadas alterações nos parâmetros bioquímicos séricos e nas análises hematológicas. O tratamento com DS12 mostrou-se capaz de melhorar a memória e as alterações neuroquímicas em um modelo de DA sem apresentar efeitos tóxicos, sugerindo o potencial terapêutico promissor deste composto.

Palavras-chave: tiazolidin-4-onas, estresse oxidativo, cérebro, doença de Alzheimer, acetilcolinesterase, ratos.

Abstract

SANTOS, Alessandra dos. Effect of the compound 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one on memory and on brain and systemic biochemical parameters in a model of sporadic dementia of the type Alzheimer, 2022. 71f. Dissertation (Master's) - Postgraduate Program in Biochemistry and Bioprospecting. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2022

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by a decline in memory and cognitive functions. It is the most common form of dementia, with a progressive and irreversible character, affecting basic daily activities in patients. AD has become a major public health problem. Among the neurochemical mechanisms associated with AD are oxidative stress and alterations in signaling mediated by cholinergic synapses. Cholinergic neurotransmission being its main therapeutic target of the available treatments for AD. The therapeutic arsenal currently available is only possible to alleviate the symptoms of this disease, being unable to prevent its progression. Therefore, the research for new therapeutic alternatives capable of preventing or delaying the progress of AD becomes increasingly relevant, in order to provide a better quality of life for patients. Thiazolidin-4-ones are compounds that have been the target of research because these compounds have pharmacological activities such as antioxidant and anticholinesterase effects. Thus, the aim of the present study was investigated the effects of the compound 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one (DS12) on memory and neurochemical parameters in an experimental model for AD induced by intracerebroventricular (ICV) injection of streptozotocin (STZ) in rats. Adult male rats were divided into five groups: I- control (saline); II - DS12 (10 mg/kg); III-STZ, IV-STZ + DS12 (10 mg/kg); V-STZ + donepezil (5 mg/kg). The treatments were performed orally for 20 days. Behavioral parameters related to memory were evaluated through object recognition and Y-maze tests. After euthanasia, the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum were collected to evaluate markers of oxidative stress and acetylcholinesterase (AChE) enzyme activity. Biochemical and hematological parameters were evaluated in blood and serum samples. The results showed that memory impairment and the increase in AChE activity induced by STZ were prevented by treatment with DS12 and donepezil. STZ also increased the reactive oxygen species levels and a decreased catalase activity in hippocampus, cerebral cortex, and cerebellum. Treatment with DS12 was capable to protect against these oxidative changes in all brain structures. No changes were observed in serum biochemical parameters and hematological analyses. Treatment with DS12 was able to improve memory and neurochemical changes in an AD model without inducing toxic effects, suggesting the promising therapeutic potential of this compound.

Keywords: thiazolidin-4-ones, oxidative stress, brain, Alzheimer's disease, acetylcholinesterase, rats.

Lista de Figuras

- Figura 1** Imagem de exame de Ressonância Magnética demonstrando a perda acentuada no volume cerebral com acentuada atrofia hipocampal em um cérebro de um paciente com Doença de Alzheimer (direita), comparado com o cérebro de uma pessoa saudável (esquerda). Adaptado de Carneloz, 2019.....23
- Figura 2** Ilustração de um cérebro saudável, um cérebro com a Doença de Alzheimer em estágio avançado e uma comparação do volume de ambos. Adaptado de Alzheimer's Association, 2020.....24
- Figura 3** Estrutura química da molécula DS12.31

Lista de Abreviaturas

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

AChEIs – Inibidores da colinesterase

APP - Proteína precursora amiloide

BChE – Butirilcolinesterase

CAT – Catalase

ChAT – Colina acetiltransferase

DA – Doença de Alzheimer

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DS12 – 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(3-(piperidina-1-il)propil)thiazolidin-4-ona

ROS – Espécies reativas de oxigênio

FDA – *Food and Drug Administration*

GSH – Glutathiona

GSH-PX – Glutathiona peroxidase

ICV – Intracerebroventricular

NMDA – N-metil-D-aspartato

OMS – Organização Mundial da Saúde

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

STZ – Estreptozotocina

β A – Beta-amiloide

Apresentação

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra no item Manuscrito. As seções: Materiais e métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

O item Discussão encontra-se também após o item manuscrito, trazendo os itens contidos no mesmo tópico do manuscrito com algumas observações adicionais.

O item Conclusões encontra-se no final desta dissertação e apresenta interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

As referências no final deste documento referem-se somente às citações contidas na Introdução e Referencial teórico desta dissertação.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica para o qual foi submetido.

Sumário

1	Introdução	15
2	Objetivos	19
2.1.	Objetivo geral	19
2.2.	Objetivos específicos	19
3	Revisão bibliográfica.....	20
3.1.	Demência.....	20
3.2.	Doença de Alzheimer.....	20
3.2.1.	Diagnóstico.....	22
3.2.2.	Etiologia e patogênese da Doença de Alzheimer	23
3.2.3.	Principais mecanismos envolvidos na fisiopatologia da DA	24
3.2.4.	Tratamento da DA e os anticolinesterásicos	27
3.3.	Tiazolidinonas	29
3.4.	Modelo experimental de DA induzido por estreptozotocina	31
4	Manuscrito.....	34
5	Discussão.....	61
6	Conclusão	63
	Referências bibliográficas	64
	Anexos	69

1 Introdução

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa de caráter progressivo e irreversível, caracterizada pelo declínio gradual da memória e funções cognitivas. Geralmente associada ao avanço da idade, esta doença vem se tornando cada vez mais prevalente na população idosa, sendo considerada a forma de demência mais comum em idosos e uma das principais causas de morte em pessoas com mais de 80 anos (Scheltens et al., 2016; Santos et al., 2020). Os prejuízos causados pela DA são prevalentemente associados à memória, mas vão desde distúrbios nas funções cognitivas até a redução no peso e volume cerebral, o que culmina no comprometimento de diversos aspectos da vida do indivíduo, acabando por incapacitá-lo, tornando-o cada vez mais dependente de cuidadores (Sereniki e Vital, 2008; Santos et al., 2020).

Diversas características envolvidas no desenvolvimento da DA são inerentes ao envelhecimento, como é o caso dos supramencionados prejuízos à memória, os quais também afetam idosos cognitivamente saudáveis (Bitencourt et al., 2019). No entanto, conforme a DA avança, o cérebro do paciente sofre uma perda progressiva de neurônios e diversas alterações estruturais em regiões específicas relacionadas à memória, como o hipocampo — o qual é uma estrutura de extrema importância para a memória episódica e está entre as primeiras regiões a sofrerem degradação mesmo em estágios pré-sintomáticos da DA (Biasibetti et al., 2017; Alzheimer's association, 2020). Além do hipocampo, os impactos da DA também afetam todo o córtex cerebral, de modo a influenciar em diversas funções do cotidiano do paciente (Abeysinghe, Deshapriya, e Udawatte, 2020). Ainda, estudos sugerem que a degeneração neuronal característica da DA também possa afetar o cerebelo, dada a alta densidade neuronal desta estrutura cerebral (Jacobs et al., 2018).

Desse modo, por ser uma doença que compromete diversas funções do sistema nervoso, a DA é um distúrbio de alta complexidade que pode ser influenciada por inúmeros fatores e envolve diversos mecanismos, os quais ainda não foram totalmente elucidados (Bitencourt et al., 2019; Scheltens et al., 2016). Entretanto, alguns fatores têm sido bem estabelecidos como possíveis responsáveis pelo desenvolvimento e progressão da doença, dentre os quais destacam-se o acúmulo de placas senis e emaranhados neurofibrilares (Trevisan et al., 2019).

As placas senis, estruturas formadas pelo acúmulo de fragmentos do peptídeo beta-amiloide (β A), podem causar neuroinflamação e prejudicar o transporte de substâncias e a transmissão sináptica entre neurônios (Vieira et al., 2014; Falco et al., 2016). Já os emaranhados neurofibrilares, formados pelo acúmulo da proteína Tau na forma hiperfosforilada, causam a degeneração neuronal, prejudicando também a transmissão sináptica (Kamat, 2015). Além destes mecanismos, outros fatores têm sido associados à patogênese da DA, dentre os quais pode-se citar o estresse oxidativo e déficits na transmissão colinérgica (Cavalcanti e Engelhardt, 2012; Bitencourt et al., 2019).

O estresse oxidativo é uma condição onde radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS) geram danos a diversas estruturas, desencadeando diversos aspectos característicos da DA, o que contribui para o início e desenvolvimento da doença (Cavalcanti e Engelhardt, 2012). Estudos indicam uma relação entre os danos oxidativos gerados às membranas lipídicas pelas ROS e a formação de placas senis e emaranhados neurofibrilares (López et al., 2012; Gemelli et al., 2013). Além disso, um dos principais mecanismos associados ao início e progressão da DA são as alterações no sistema colinérgico, o qual está relacionado com diversos processos importantes, como aprendizagem e memória. Portanto, déficits na transmissão colinérgica e em seus neurotransmissores podem impactar no desenvolvimento e progressão da DA (Farlow et al., 2010; Mota et al., 2012).

Quanto à terapêutica utilizada no tratamento da DA, considerando o caráter multifatorial da doença, faz-se necessário o uso de medicamentos que interfiram não somente na fisiopatologia, mas também nas alterações comportamentais geradas pela DA (Bitencourt et al., 2019). Portanto, dado o impacto que alterações no sistema colinérgico causam tanto na cognição como no comportamento dos pacientes, uma das principais abordagens farmacológicas utilizadas no tratamento da DA envolve o uso de anticolinesterásicos. Essa classe de medicamentos aumenta a disponibilidade do principal neurotransmissor colinérgico e tem se mostrado eficiente na diminuição dos sintomas da doença (Huang, Chao e Hu, 2020). No entanto, os medicamentos atualmente utilizados no tratamento da doença de Alzheimer não impedem o avanço da doença e, além disso, possuem diversos efeitos colaterais, o que tem tornado seu uso insatisfatório (Vaz e Silvestre, 2020).

Dessa forma, torna-se relevante a busca por alternativas terapêuticas que atuem no sistema colinérgico e que possam proporcionar maior segurança e efetividade para os pacientes, a fim de melhorar a qualidade de vida de portadores de doenças neurodegenerativas, como a DA (Vaz e Silvestre, 2020).

Nesse sentido, as 4-tiazolidinonas (substâncias que fazem parte de uma classe de compostos aos quais podem ser atribuídas diferentes atividades biológicas e farmacológicas) têm sido alvo de pesquisas do nosso grupo, onde demonstraram *in vitro* o potencial anticolinesterásico dessas moléculas (Berwaldt et al., 2019; Da Silva et al., 2021). Considerando os resultados promissores obtidos nesses estudos, o efeito do composto 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(3-(piperidina-1-il)propil)thiazolidin-4-ona (DS12) foi avaliado em um modelo *in vivo* de amnésia induzido por escopolamina, onde a molécula DS12 mostrou-se capaz de prevenir déficits de memória, alterações colinérgicas e estresse oxidativo em córtex cerebral e hipocampo de ratos. Ainda, a molécula em estudo demonstrou ausência de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade em ratos em estudos anteriores na dose de 10 mg/kg (Da Silva et al., 2021).

O modelo de injeção de escopolamina, utilizado anteriormente para avaliar os efeitos da DS12 *in vivo*, mimetiza algumas alterações presentes na DA, como déficits de memória e aprendizagem, déficits colinérgicos e comprometimento em processos visuoperceptivos, induzindo um modelo eficiente de amnésia temporária nos animais – o que permitiu avaliar o potencial do tratamento em prevenir o desenvolvimento de um quadro de demência, trazendo resultados promissores (Riedel et al., 2009; Kumar et al., 2016). Já o modelo de indução de demência esporádica do tipo Alzheimer induzido por injeção ICV de STZ é um modelo capaz de mimetizar alterações mais complexas presentes na DA esporádica em humanos, como aumento na liberação de ROS e espécies reativas de nitrogênio; prejuízos no metabolismo de glicose; atividade aumentada da AChE e diminuição dos níveis de ACh; além de formação de agregados semelhantes a peptídeos β A (Sharma, Briyal e Gupta, 2005; Yang et al., 2013; Correia et al., 2013). Portanto, testar os efeitos da molécula em estudo neste modelo nos permitiu estimar o potencial dela em reverter parâmetros mais complexos no decorrer do desenvolvimento da doença.

Diante deste contexto, considerando: *i)* o impacto que a DA causa na vida do paciente, dos cuidadores e na saúde pública; *ii)* a falta de efetividade dos atuais

tratamentos disponíveis em impedir o avanço da doença; *iii*) os resultados promissores obtidos até então nos estudos envolvendo as 4-tiazolidinonas, torna-se relevante o desenvolvimento de estudos mais aprofundados a fim de elucidar o potencial terapêutico do composto 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(3-(piperidin-1-il)propil)tiazolidin-4-ona (DS12) em mecanismos associados à DA utilizando um modelo experimental de DA induzido por estreptozotocina.

2 Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos do composto 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(3-(piperidin-1-il)propil)tiiazolidin-4-ona (DS12) na memória e em parâmetros bioquímicos cerebrais e sistêmicos em um modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer induzido por administração intracerebroventricular de estreptozotocina (STZ).

2.2. Objetivos específicos

Em ratos submetidos a um modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer induzido por STZ e tratados com DS12 ou donepezil foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Memória através dos testes de reconhecimento de objetos e labirinto em Y;
- Atividade locomotora através do teste do campo aberto;
- Atividade da acetilcolinesterase em córtex cerebral, hipocampo e cerebelo;
- Parâmetros de estresse oxidativo como níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) e conteúdo tiólico total;
- Atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase em córtex cerebral, hipocampo e cerebelo;
- Parâmetros bioquímicos séricos como glicose, colesterol, triglicerídeos e ureia;
- Parâmetros hematológicos: eritrograma, leucograma e análise plasmática de proteínas.

3 Revisão bibliográfica

3.1. Demência

Demência é um termo utilizado para descrever os sintomas de um grupo de doenças caracterizadas por um declínio cognitivo e pode ser descrita como uma desordem cerebral de caráter neurodegenerativo e progressivo, afetando diversos parâmetros, como: linguagem, orientação espacial, raciocínio, capacidade de aprendizado, julgamento e memória (Trevisan et al., 2019; Alzheimer's Association, 2020). A deterioração substancial destas habilidades causa grandes prejuízos no funcionamento social e ocupacional dos portadores de demências pois leva à incapacitação dos mesmos conforme a doença avança (NCCMH, 2007; Biasibetti et al., 2017).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a demência foi a sétima causa de mortes no mundo em 2019, afetando atualmente mais de 55 milhões de pessoas e, espera-se que este número atinja a marca de 139 milhões até 2050 (OMS, 2020). A demência tem a idade como principal fator de risco, de modo que aproximadamente 10% de todas as pessoas acima de 65 anos possuam algum tipo de demência (Biasibetti et al., 2017; Alzheimer's Association, 2020).

3.2. Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é considerada a forma mais comum de demência, sendo responsável por cerca de 50 a 70% dos casos e apontada como a quarta maior causa de morte em pessoas com mais de 80 anos (Santos et al., 2020). A DA é uma patologia de caráter neurodegenerativo, progressivo e irreversível, associada geralmente ao avanço da idade, cujas primeiras manifestações clínicas são associadas a déficits de memória e outras funções cognitivas (Scheltens et al., 2016).

As principais características associadas à DA são distúrbios nas funções cognitivas, bem como na memória a curto prazo (Santos et al., 2020). Assim, como nas demais formas de demência, tais prejuízos atingem diversos domínios à medida que a doença avança, de modo que, com o passar do tempo, o paciente perde gradualmente sua autonomia, tornando-se incapaz de desenvolver atividades do cotidiano, bem como de cuidar de si (Luzardo et al., 2006). Essas mudanças ocorrem devido a diversos fatores, como degeneração neuronal, baixos níveis de

neurotransmissores no cérebro e, por consequência, diminuição nas sinapses (Abeysinghe et al., 2020).

O quadro clínico da DA é dividido em três fases: 1) Fase inicial: com duração de 2 a 3 anos, caracterizada pela perda de memória recente. Além disso, conforme a doença avança, a deterioração na capacidade de aprendizado e linguagem torna-se cada vez mais recorrente (Santos et al., 2020). 2) Fase intermediária: tem duração de 2 a 10 anos e nesta fase o indivíduo já não possui mais a capacidade de aprendizagem e de guardar informações e sua linguagem começa a apresentar sinais de limitação (Bitencourt et al., 2019). 3) Fase final: sua duração pode variar entre 8 e 12 anos. Nela, ocorrem alterações severas nos aspectos cognitivos, onde o indivíduo pode apresentar quadros de incontinência urinária e fecal e, muitas vezes, não se locomove nem se comunica mais (Luzardo et al., 2006; Cavalcanti e Engelhardt, 2012).

A DA pode ser classificada como familiar e esporádica. A DA do tipo familiar costuma ocorrer de maneira mais precoce, afetando indivíduos entre 40 a 60 anos, e é influenciada por fatores genéticos, como mutações autossômicas dominantes nos genes da proteína precursora amiloide (APP) e presenilinas 1 e 2. Já a DA do tipo esporádico é responsável pela maioria dos casos de portadores desta doença e ocorre geralmente em pessoas acima de 65 anos, sendo influenciada por fatores ambientais, como tabagismo, alcoolismo, baixo nível educacional, entre outros (Biasibetti et al., 2017; Abeysinghe et al., 2020).

Conforme a DA avança, diversos parâmetros são envolvidos, havendo um comprometimento severo em diferentes tipos de memória, como a memória espacial e a memória de trabalho (Ang e Lee, 2008; Kraeuter, Guest e Sarnyai, 2018). Memória espacial é a forma de memória que envolve a habilidade de registrar e recuperar informações sobre localização espacial, necessária para diversas atividades da vida diária, como planejar rotas para um local ou recordar a localização de um objeto. Este tipo de memória é avaliado em modelos comportamentais envolvendo roedores através do teste comportamental do labirinto em Y (Denos, Hasboun e Baulac, 2004; Kraeuter, Guest e Sarnyai, 2018). A memória de trabalho possui grande influência na aprendizagem, permitindo o armazenamento e retenção temporária de informações enquanto uma determinada tarefa está sendo realizada, fornecendo suporte às atividades cognitivas (Alloway e Gathercole, 2006; Schurgin, 2018). Este tipo de memória é avaliado através da tarefa de reconhecimento de objetos, que se baseia

na tendência natural do animal em explorar mais o objeto novo em detrimento ao familiar, num contexto conhecido (Baddeley, 2000; Kraeuter, Guest e Sarnyai, 2018).

3.2.1. Diagnóstico

Diversas características da DA são inerentes ao envelhecimento, estando presentes também em idosos cognitivamente saudáveis (Bitencourt et al., 2019). Logo, o diagnóstico da DA torna-se difícil, de modo que ainda não existem exames capazes de confirmá-lo, sendo que o mesmo é baseado em alterações cognitivas e comportamentais apresentadas pelo paciente, bem como no histórico familiar e exames sanguíneos e neurológicos. Somente através de exames *post mortem* é possível comprovar o diagnóstico da doença (Alzheimer's Association, 2020).

No entanto, dada a dificuldade em determinar com precisão as causas da doença, bem como em fornecer um diagnóstico preciso, existem estudos que sugerem que a medida da atrofia hipocampal por ressonância magnética (figura 1) pode ser utilizada como marcador para DA precoce em pacientes com comprometimento cognitivo leve, visto que o hipocampo é uma das primeiras regiões afetadas na DA (Abeysinghe et al., 2020; Alzheimer's Association, 2020). Além disso, o uso de biomarcadores específicos para danos neuronais relacionados à memória tem se mostrado cada vez mais relevante no auxílio ao diagnóstico da doença mesmo em estágios prodrômicos, o que permite a realização de intervenções terapêuticas mais precoces. Dentre estes biomarcadores, destacam-se os de βA e os da proteína Tau, os quais podem ser quantificadas no líquido de forma confiável. Com a morte neuronal, a proteína Tau na forma fosforilada é eliminada no líquido, aumentando sua concentração; e o acúmulo de βA no cérebro faz com que sua concentração no líquido seja reduzida (Cavalcanti e Engelhardt, 2012; Alzheimer's association, 2020).

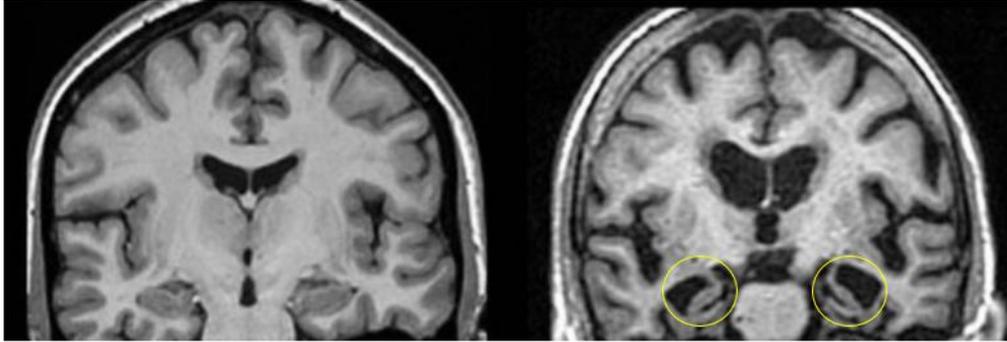


Figura 1. Imagem de exame de Ressonância Magnética demonstrando a perda acentuada no volume cerebral com acentuada atrofia hipocampal em cérebro de paciente com Doença de Alzheimer (direita), comparado com o cérebro de uma pessoa saudável (esquerda). Adaptado de Carneloz, 2019.

3.2.2. Etiologia e patogênese da Doença de Alzheimer

Embora haja uma base de dados concisa sobre a degradação que a DA causa na memória e cognição dos pacientes, ainda não está totalmente elucidada a etiologia da doença. Estima-se que a DA provavelmente resulte da combinação de diversos fatores, tanto de origem genética quanto ambiental (Peinado et al., 2000; Abeysinghe et al., 2020). Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de DA identificados até o momento relacionam-se principalmente com o avanço da idade, mas outros aspectos podem impactar tanto no desenvolvimento como prevenção da doença (Ferrari et al., 2014).

Baixo nível educacional e ocupacional, distúrbios do sono, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, obesidade, tabagismo, alcoolismo, hipertensão, diabetes mellitus e depressão têm sido considerados fatores que podem predispor ao desenvolvimento de DA (Biasibetti et al., 2017; Abeysinghe et al., 2020). No entanto, fatores como alto nível de instrução, prática regular de exercício físico e certos padrões de dieta podem auxiliar na prevenção ou no atraso da progressão da doença (Vellas et al., 2005; Biasibetti et al., 2017).

Além disso, também são observadas diferenças no desenvolvimento e progressão da DA entre indivíduos de diferentes sexos biológicos, onde mulheres cis correspondem a dois terços da população afetada pela doença (Irvine et al., 2012). No entanto, em relação à progressão em homens cis, esta forma de demência avança com maior severidade e com uma evolução mais acelerada, enquanto que nas mulheres costuma se estender por um maior período e apresentar menor severidade (Abeysinghe et al., 2020).

Quanto à patogênese da DA, diversos mecanismos estão envolvidos na morte celular característica da doença, de modo que o cérebro de um portador da DA sofre uma perda progressiva de neurônios e diversas alterações estruturais — inicialmente em regiões cerebrais específicas relacionadas à memória, mas conforme a doença avança, há uma diminuição no volume cerebral total (figura 2), o que impacta em todas as funções cerebrais (Peinado et al., 2000).

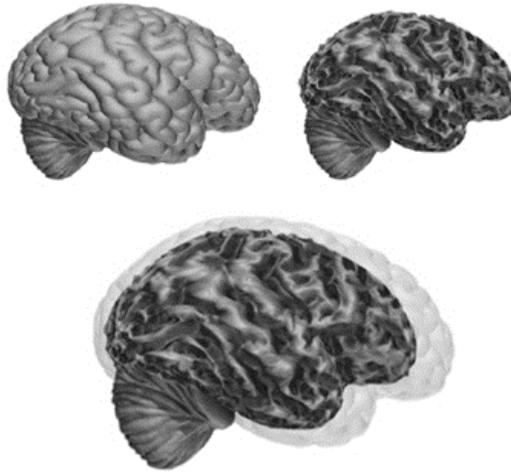


Figura 2. Ilustração de um cérebro saudável, um cérebro com a Doença de Alzheimer em estágio avançado e uma comparação do volume de ambos. Adaptado de Alzheimer's Association, 2020.

Dentre as principais regiões acometidas pela DA cabe mencionar o hipocampo, pois é uma estrutura crítica para memória episódica que está entre as primeiras a sofrerem alterações estruturais mesmo em estágios pré-sintomáticos da doença (Biasibetti et al., 2017; Alzheimer's association, 2020). Além disso, a degeneração causada pela DA impacta grandemente todo o córtex cerebral, o qual é responsável por diversas funções essenciais, como: linguagem, percepção sensorial, raciocínio, memória e comando da motricidade (Abeysinghe et al., 2020; Alzheimer's association, 2020).

3.2.3. Principais mecanismos envolvidos na fisiopatologia da DA

Sabe-se que a degeneração neuronal causada pela DA é bastante extensa, atingindo diversas regiões cerebrais conforme a doença evolui. Os déficits na atividade cerebral característicos da doença se devem às alterações estruturais que a mesma causa (Peinado et al., 2000). Além disso, o cérebro de um indivíduo com DA possui menos células nervosas e sinapses quando comparado a um cérebro

saudável. Embora a causa associada a morte de células neuronais nesta patologia ainda seja desconhecida, algumas hipóteses têm sido estabelecidas na literatura, tais como o acúmulo de placas senis e emaranhados neurofibrilares (Trevisan et al., 2019).

As placas senis são formadas pelo acúmulo de fragmentos do peptídeo beta-amiloide (β A) e produtos originados através da clivagem de sua proteína precursora, a proteína precursora amiloide (APP). A APP é clivada em diferentes lugares por duas secretases, a γ -secretase e a β -secretase, dando origem a diversos fragmentos, como é o caso do peptídeo β A, que exerce uma ação inibitória sobre o potencial de longa duração (responsável por melhorar a transmissão sináptica entre os neurônios) (Falco et al., 2016). Em condições normais, o β A encontra-se em níveis baixos no sistema nervoso central (SNC), entretanto, pode ocorrer o acúmulo deste peptídeo por meio de defeitos na sua remoção — o que pode gerar alterações vasculares e neuroinflamação através da redução da permeabilidade da barreira hematoencefálica, prejudicando o transporte de substâncias essenciais para o funcionamento do encéfalo. Portanto, a produção de β A no cérebro dá origem a uma cascata de eventos neurotóxicos, formando placas senis e, desta forma, contribuindo para o surgimento da DA (Vieira et al., 2014).

Além disso, a hiperfosforilação da proteína Tau também é descrita como um dos mecanismos mais bem estabelecidos no desenvolvimento e avanço da DA (Cavalcanti e Engelhardt, 2012). A Tau é uma proteína cuja função é estabilizar microtúbulos no citoesqueleto, o que é fundamental no desenvolvimento neuronal. Essa proteína normalmente é solúvel, no entanto, em quadros de DA a mesma encontra-se fosforilada na forma de um polímero filamentosos, o qual associado aos microtúbulos é o principal componente dos emaranhados neurofibrilares presentes nas células nervosas danificadas na DA (Kamat, 2015; Falco et al., 2016).

Além dos mecanismos de degeneração supracitados, outros fatores têm sido associados à patogênese da DA, dentre os quais pode-se citar o estresse oxidativo e déficits na transmissão colinérgica (Cavalcanti e Engelhardt, 2012; Bitencourt et al., 2019).

3.2.3.1. Estresse Oxidativo e DA

Estresse oxidativo é uma condição onde há um desequilíbrio entre a formação de compostos oxidantes e a ação dos sistemas antioxidantes do organismo, gerando

radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Barbosa et al., 2010). Em condições celulares normais, ROS atuam mediando processos celulares, como resposta imune e sinalização celular. No entanto, quando há um aumento de espécies reativas, sobrepondo-se às defesas antioxidantes, essas espécies podem gerar danos a diversas estruturas, como proteínas, lipídios e DNA, contribuindo para o desenvolvimento de várias patologias, como a DA (Sereniki e Vital, 2008; Cavalcanti e Engelhardt, 2012).

Com o intuito de proteger as células contra os efeitos nocivos causados pelas espécies reativas, o organismo conta com a ação dos sistemas antioxidantes, os quais atuam protegendo e reparando os efeitos deletérios causados pelos agentes oxidantes, bem como prevenindo o acúmulo de moléculas alteradas pela ação destes agentes (López et al., 2012). Os sistemas antioxidantes presentes no organismo podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos. O sistema antioxidante enzimático ou endógeno inclui enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GSH-PX), as quais atuam em conjunto prevenindo o dano tecidual causado pela ação dos radicais livres. O sistema antioxidante não enzimático ou exógeno atua retardando a produção e a ação dos radicais livres e é composto principalmente pela glutathiona (GSH), ácido ascórbico (vitamina C) e o α -tocoferol (vitamina E) (Lademann et al., 2011; López et al., 2012).

Estudos apontam a oxidação de lipoproteínas associadas ao SNC como possíveis agentes causadores dos danos celulares presentes na DA. O peptídeo β -amiloide está amplamente relacionado ao dano oxidativo que ocorre às membranas lipídicas, pois altera a função de transportadores, enzimas e receptores celulares localizados nessas membranas (Vannucci et al., 1998; López et al., 2012). Além disso, as ROS também têm relação com outra das principais estruturas características da DA: os emaranhados neurofibrilares. Estudos demonstraram uma alteração na conformação dos lipídios de membrana através da ação de ROS, o que levou à formação destes emaranhados em pacientes portadores de DA (Gemelli et al., 2013).

3.2.3.2. Sistema colinérgico e DA

Uma das hipóteses mais bem estabelecidas na literatura para o desenvolvimento da DA é a hipótese colinérgica, onde se estima que alterações no sistema colinérgico sejam capazes de influenciar em diversos aspectos na vida dos

pacientes. O sistema colinérgico é composto pelo neurotransmissor acetilcolina (ACh), seus receptores e o aparato enzimático responsável por sua síntese e degradação (Vellas et al., 2005; Mota et al., 2012).

A ACh é sintetizada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) no citosol dos neurônios colinérgicos pré-sinápticos a partir de colina e acetil-CoA. Após sua síntese, a ACh é armazenada em vesículas sinápticas e liberada na fenda sináptica, onde exerce sua função de propagação de informações entre as sinapses nervosas (Mota et al., 2012; Araújo, Santos e Gonsalves, 2016). A atividade desse neurotransmissor é interrompida quando o mesmo é hidrolisado pelas enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) em acetato e colina. Essas moléculas de acetato e colina são recaptadas pelo o neurônio pré-sináptico, onde podem ser utilizadas para síntese de novas moléculas de ACh (Ventura et al., 2010; Araújo, Santos e Gonsalves, 2016).

No aspecto neuropatológico, a DA se caracteriza principalmente pela falha nas sinapses entre os neurônios e degeneração neuronal, especialmente dos neurônios colinérgicos. Os neurônios colinérgicos possuem seus corpos localizados principalmente no núcleo septal medial e no núcleo basal de Meynert, os quais inervam regiões cerebrais bastante importantes, como o hipocampo e região frontal, temporal e parietal do córtex cerebral, respectivamente (Bassani et al., 2018). A morte de neurônios nessas estruturas impacta diversos aspectos envolvidos não só na cognição do paciente como em seu comportamento — visto que o sistema colinérgico está relacionado com diversos processos importantes, como atenção, resposta ao estresse, sono, vigília e, principalmente, aprendizagem e memória (Mota et al., 2012; Araújo, Santos e Gonsalves, 2016).

3.2.4. Tratamento da DA e os anticolinesterásicos

O tratamento para a doença de Alzheimer requer o uso de agentes farmacológicos que atuem em sintomas específicos, bem como intervenções comportamentais que possam melhorar sintomas e atividades diárias do paciente (Bitencourt et al., 2019).

Quanto à terapêutica farmacológica, dado o impacto que alterações no sistema colinérgico causam tanto na cognição como no comportamento dos pacientes, somado ao fato de na DA haver uma perda significativa no número de neurônios

colinérgicos, uma das abordagens farmacológicas mais amplamente utilizadas no tratamento da DA envolve o uso de anticolinesterásicos (Araújo, Santos e Gonsalves, 2016; Huang, Chao e Hu, 2020). Esses medicamentos inibidores da colinesterase (AChEIs) têm como objetivo aumentar a disponibilidade de ACh na fenda sináptica, aumentando, portanto, seus efeitos (Huang, Chao e Hu, 2020).

Estima-se que ao elevar a quantidade de ACh na fenda sináptica seja possível reverter alguns dos déficits de memória causados pela DA e, para tanto, utilizam-se inibidores da AChE, os quais permitem com que a ACh permaneça ativa na fenda sináptica por um período maior de tempo, elevando a transmissão colinérgica (Mota et al., 2012; Araújo, Santos e Gonsalves, 2016).

Atualmente, existem pelo menos três AChEIs aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) como terapêutica para DA. O uso destes medicamentos tem proporcionado melhora clínica cognitiva e global nos pacientes, melhorando assim sua qualidade de vida (Huang, Chao e Hu, 2020). Dentre os principais AChEIs utilizados no tratamento da DA pode-se citar a donepezila, galantamina, e rivastigmina, os quais têm eficácia semelhante, apesar de possuírem farmacocinética e farmacodinâmica distintas (Raina et al., 2008; Vaz e Silvestre, 2020). Os AChEIs apresentam eficácia comprovada em pacientes com DA leve e moderada, no entanto, efeitos gastrointestinais como náuseas, vômitos e diarreia costumam ser recorrentes ao longo do tratamento com estes medicamentos (Vaz e Silvestre, 2020).

Além dos AChEIs, um dos principais medicamentos atualmente utilizados no tratamento da DA é a memantina: um fármaco com propriedades neuroprotetoras e capazes de potencializar a cognição (Tanovic et al., 2006). A memantina é um antagonista não competitivo de N-metil-D-aspartato (NMDA), cujo mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido. Acredita-se que a memantina consiga melhorar a transmissão glutamatérgica que, assim como a colinérgica, encontra-se comprometida na DA (Tanovic et al., 2006; Vaz e Silvestre, 2020). Eficaz mesmo em estágios moderados e graves da DA, quando usada como monoterapia, a memantina demonstrou efeitos ainda melhores quando associada ao tratamento com AChEIs (Vaz e Silvestre, 2020).

Ainda, a FDA recentemente aprovou o uso de um novo medicamento para o tratamento da DA: o Aduhelm (aducanumabe), um fármaco produzido pela Biogen

(empresa do ramo da biotecnologia que conduz pesquisas científicas para tratar doenças neurodegenerativas), cuja proposta é tratar pacientes com diagnóstico precoce de Alzheimer (FDA, 2021; Steinbrook, 2021). Estima-se que o Aduhelm seja capaz de remover depósitos do peptídeo β A, evitando, portanto, a formação de placas senis e, dessa forma, a progressão da doença seja retardada (FDA, 2021; Tanzi, 2021). No entanto, os efeitos adversos do medicamento (inchaço e sangramentos cerebrais) têm causado certa preocupação, de modo que a FDA determinou que a Biogen desenvolva mais pesquisas acerca dos benefícios clínicos do uso dessa medicação (Tanzi, 2021; Steinbrook, 2021).

É importante ressaltar que os principais medicamentos utilizados atualmente no tratamento da DA não possuem eficiência satisfatória e, além disso, apresentam diversos efeitos colaterais (Vaz e Silvestre, 2020). Sendo assim, a busca por tratamentos mais eficazes que possam proporcionar maior segurança para os pacientes tem aumentado e, dessa forma, a descoberta de novas moléculas potencialmente mais seguras tem se mostrado promissora para o tratamento de diversas doenças neurodegenerativas, como a DA (Vercoza et al., 2009).

3.3. Tiazolidinonas

As pesquisas na área da química orgânica têm sido cada vez mais voltadas para o desenvolvimento de moléculas com propriedades terapêuticas que possam contribuir para o desenvolvimento de fármacos (Jain et al., 2012; Tripathi et al., 2014). Dentre estas moléculas, destacam-se as tiazolidinonas, mais especificamente as 4-tiazolidinonas, as quais fazem parte de uma classe de compostos que possuem um anel heterocíclico com vários sítios de substituição, possibilitando, portanto, diversas moléculas análogas, às quais podem ser atribuídas diferentes atividades biológicas e farmacológicas, tais como: antibacteriana (Omar et al., 2010), anti-inflamatória (Deep et al., 2012), antioxidante (Shih e Ke, 2004), antitumoral (Havrylyuk, Zimenkovsky e Lesyk, 2009), e anticolinesterásica (da Silva et al., 2021).

Os mecanismos de ação através dos quais as tiazolidinonas exercem suas atividades antitumorais ainda não foram elucidados, no entanto, estima-se que esses compostos atuem no controle da proliferação celular por meio da indução de apoptose e através da inibição de ciclooxygenases (Da Silva et al., 2021). Silva e colaboradores

realizaram a síntese de diferentes tiazolidinonas com ligantes distintos de modo a avaliar a atividade antitumoral e a citotoxicidade dessas moléculas *in vitro*, onde observaram em algumas das moléculas analisadas um potencial efeito antiglioma, bem como boa janela terapêutica e perfil seguro de toxicidade (Da Silva et al., 2016). Neste estudo, os pesquisadores substituíram dois radicais em uma molécula base de tiazolidinona por diferentes grupamentos e, dessa forma, sintetizaram quatorze compostos. Dentre as moléculas sintetizadas, as que possuíam os grupamentos 2-(4-metiltio)fenil e propilpiperidina apresentaram melhor efeito nos parâmetros avaliados quando comparadas com as demais (Da Silva et al., 2016).

O composto sintético 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(3-(piperidin-1-il)propil)tiazolidin-4-ona (DS12) (figura 3) foi avaliado por Silva e colaboradores em um modelo *in vivo*, a fim de determinar os efeitos potenciais desse composto na proteção contra o déficit de memória e as alterações neuroquímicas causadas por um modelo de amnésia induzido por escopolamina em ratos (Da Silva et al., 2021). Neste experimento foi realizado um pré-tratamento durante sete dias com DS12 em duas concentrações (5 e 10 mg/kg) e, ao final dos sete dias de tratamento, a escopolamina foi administrada via intraperitoneal na dose de 1 mg/kg. Com o intuito de avaliar a consolidação da memória dos animais, os pesquisadores realizaram o teste comportamental de esQUIVA inibitória. Além disso, diversas dosagens bioquímicas em diferentes tecidos foram realizadas com o objetivo de determinar a toxicidade da molécula e se o tratamento preventivo com DS12 conseguiria prevenir os danos causados pela escopolamina em diferentes estruturas (Da Silva et al., 2021). Os resultados obtidos demonstraram que o composto DS12 em ambas as concentrações foi capaz de prevenir a perda de memória induzida pela escopolamina. Já nas análises bioquímicas, o grupo escopolamina não tratado apresentou diversas alterações quando comparado com o grupo controle, como: níveis de ROS e TBARS significativamente aumentados; diminuição na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT e aumento da atividade de AChE e BuChE. O tratamento com DS12 foi capaz de prevenir todas essas alterações. Além disso, a DS12 mostrou-se um tratamento seguro, visto que não causou alterações nos parâmetros bioquímicos avaliados quando comparada com o grupo controle (Da Silva et al., 2021).

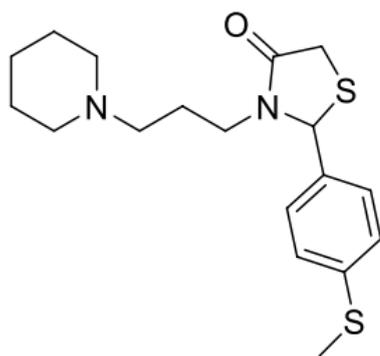


Figura 3. Estrutura química da molécula DS12.

Dentre as diversas atividades atribuídas às tiazolidinonas nos últimos anos, a atividade anticolinesterásica vem ganhando destaque na pesquisa, dada sua importância no tratamento da DA. Silva e colaboradores também demonstraram que o composto DS12 foi capaz de inibir a atividade da AChE e da BuChE em córtex cerebral, hipocampo, linfócitos e soro de ratos submetidos a um modelo de amnésia induzido por escopolamina (Da Silva et al., 2021). Considerando que o composto DS12 já apresentou atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticolinesterásicas em um modelo *in vivo* de déficit de memória (Da Silva et al., 2021); testar os efeitos deste composto em outro modelo experimental de DA permitirá analisar o potencial da DS12 em reverter parâmetros mais complexos associados a neurodegeneração.

3.4. Modelo experimental de DA induzido por estreptozotocina

A fim de elucidar as bases fisiopatológicas de doenças, bem como avaliar seus mecanismos e desenvolver potenciais tratamentos para estas desordens, modelos experimentais que mimetizem algumas características dessas doenças são utilizados na pesquisa pré-clínica (Biasibetti et al., 2017). Dentre estes modelos, a injeção intracerebroventricular (ICV) de estreptozotocina (STZ) tem se mostrado um modelo não transgênico capaz de mimetizar características neuroquímicas e comportamentais apresentadas pela DA esporádica (Bassani et al., 2018).

A STZ é um fármaco de ação antibiótica, geralmente utilizado experimentalmente para indução de modelos de diabetes pela via sistêmica em roedores (Santos et al., 2012). No entanto, ao ser administrada em doses subdiabetogênicas pela via ICV em concentrações de 0,1 a 3 mg/kg em roedores e, recentemente, em primatas não-humanos, a STZ é capaz de induzir diversas

características semelhantes às apresentadas por pacientes portadores de DA, sendo um modelo bem estabelecido na literatura para indução de demência esporádica do tipo Alzheimer (Rodríguez-Méndez et al., 2018).

Quando administrada pela via sistêmica na dose de 50 mg/kg a STZ atua no pâncreas, onde danifica de forma irreversível as células beta pancreáticas (responsáveis pela produção de insulina), causando, portanto, um quadro de diabetes (Rodríguez-Méndez et al., 2018). Devido à incapacidade da STZ de atravessar a barreira hematoencefálica, sua administração via ICV não ocasiona comprometimento sistêmico (De La Monte e Wands, 2005).

Por outro lado, quando administrada pela via ICV, os mecanismos responsáveis pelas alterações que mimetizam demência neste modelo ainda não foram totalmente esclarecidos (Santos et al., 2012). No entanto, estima-se que a STZ seja captada pelas células através de transportadores de glicose (presentes em regiões específicas do cérebro compatíveis com as principais regiões a sofrerem lesões na DA), e sua metabolização cause a fragmentação do DNA celular, favorecendo a formação de radicais livres, o que causa estresse oxidativo — o qual, por sua vez, provoca extenso dano neuronal, desencadeando quadros de neuroinflamação e morte celular (Szkudelski, 2001). Além disso, ao ser administrada via ICV, a STZ causa uma dessensibilização nos receptores de insulina e dos fatores de crescimento semelhantes à insulina causando um distúrbio no metabolismo da glicose cerebral (De La Monte e Wands, 2005).

Dentre as principais características induzidas pelo modelo STZ-ICV estão o estresse oxidativo (Rajasekar et al., 2017; Rodríguez-Méndez et al., 2018), prejuízos ao sistema colinérgico (Santos et al., 2012; Chen et al., 2013), neuroinflamação (Chen et al., 2013; Rajasekar et al., 2017), aumento na expressão de proteína Tau hiperfosforilada, bem como na produção do peptídeo β A (Santos et al., 2012), entre outras, resultando em prejuízos na memória, cognição e orientação espacial dos animais (Bassani et al., 2018).

As alterações bioquímicas supramencionadas são bastante semelhantes às produzidas em cérebros de portadores de DA, e por essa razão o modelo de indução de demência esporádica do tipo Alzheimer através da injeção ICV de STZ tem sido

bem aceito como modelo experimental para DA (De La Monte e Wands, 2005; Santos et al., 2012).

4 Manuscrito

Thiazolidin-4-one prevents against memory deficits and neurochemical changes in cerebral cortex, hippocampus and cerebellum induced by Alzheimer disease model in rats

Alessandra dos Santos, Fernanda Cardoso Teixeira, Daniel Schuch da Silva, Tayná Amaral Veleda, Julia Eisenhart de Mello, Karina Pereira Luduvico, Francieli Moro Stefanello, Wilson Cunico Filho, Roselia Maria Spanevello

O manuscrito está nas normas da revista *Psychopharmacology*.

Thiazolidin-4-one prevents against memory deficits and neurochemical changes in cerebral cortex, hippocampus and cerebellum induced by Alzheimer disease model in rats

Alessandra dos Santos^a, Fernanda Cardoso Teixeira^a, Daniel Schuch da Silva^b, Tayná Amaral Veleda^c, Julia Eisenhart de Mello^a, Karina Pereira Luduvico^c, Francieli Moro Stefanello^c, Wilson Cunico Filho^b, Roselia Maria Spanevello^{a*}

^a Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

^b Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Laboratório de Química Aplicada a Bioativos, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

^d Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Laboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

* **Corresponding author:** Roselia Maria Spanevello - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Capão do Leão, 96010-900 Pelotas, RS, Brazil Phone: +55 53 39217355 E-mail: roselia.spanevello@ufpel.edu.br or rspanevello@gmail.com

Acknowledgments

This research was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Grant 310472/2021-0) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (Grant FAPERGS - PRONEM processo: 16/2551-0000 2452). This study was financed in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Finance code 001. R.M.S is recipient of CNPq fellowship (310472/2021-0).

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Abstract

Background: Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease characterized mostly by memory decline. The current therapeutic arsenal for treating AD is limited, and the available drugs only produce symptomatic benefits, but do not stop disease progression. The search for effective therapeutic alternatives with multitarget actions is therefore imperative. One such a potential alternative is thiazolidin-4-one, a compound that exhibits anti-amnesic, anticholinesterase, and antioxidant activities. **Objective:** To evaluate the effects of 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl) thiazolidin-4-one (DS12) on memory and neurochemical parameters in a model of AD induced by an intracerebroventricular injection of streptozotocin (STZ). **Methods:** Adult male rats were divided into five groups: I, control (saline); II, DS12 (10 mg/kg); III, STZ; IV, STZ + DS12 (10 mg/kg); V, STZ + donepezil (5 mg/kg). The rats were orally treated with DS12 and donepezil for a period of 20 days. In the end of the experiment, memory was evaluated. Acetylcholinesterase (AChE) activity and oxidative stress were analyzed in the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum. **Results:** Biochemical and haematological parameters were evaluated in the blood and serum. Memory impairment and the increase in AChE activity induced by STZ were prevented by DS12 and donepezil treatment. STZ induces an increase in reactive oxygen species levels and a decrease in catalase activity in the hippocampus, cerebral cortex, and cerebellum. DS12 treatment conferred protection from oxidative alterations in all brain structures. No changes were observed in serum biochemical parameters (glucose, triglycerides, cholesterol, uric acid, and urea) or hematological parameters, such as platelets, lymphocytes, hemoglobin, hematocrit, and total plasma protein. **Conclusion:** DS12 improved memory and neurochemical changes in an AD model and did not show toxic effects, suggesting the promising therapeutic potential of this compound.

Keywords: thiazolidin-4-ones, oxidative stress, brain, Alzheimer's disease, acetylcholinesterase, rats.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia and has become an ever-growing public health concern, with significant individual morbidity, mortality, and economic impact on the healthcare system (Dubois et al. 2016). AD is a highly debilitating neurodegenerative disease characterized by gradual decline in memory and other cognitive functions (Sereniki and Vital 2008; Santos et al. 2020). Patients who suffer from AD progressively lose neurons and undergo several structural region-specific changes; these regions can include the hippocampus, cerebral cortex, and cerebellum (Price et al. 2001; Jacobs et al. 2018). The main neuropathological findings that characterize AD are the accumulation of senile plaques and neurofibrillary tangles consisting of hyperphosphorylated tau, as well as oxidative stress and cholinergic neuron dysfunction (Trevisan et al. 2019). Studies have indicated a synergistic relationship between these factors that affects the onset and progression of AD (Gemelli et al. 2013; López et al. 2012; Dubois et al. 2016; Bitencourt et al. 2019).

Concerning current treatment methods, the therapy available for the treatment of AD is limited, and the available drugs appear to only produce moderate symptomatic benefits but have hitherto had no effect on disease progression (Bitencourt et al. 2019; Konstantina and Papageorgiou 2020). The search for novel therapeutic alternatives targeting specific pathogenic mechanisms has been a major study focus, with the hopes of discovering novel therapies capable of interfering with AD progression in the future (Yiannopoulou and Papageorgiou 2020). When seeking new treatments, it is important to consider that AD is a multifactorial disease with complex pathophysiology, therefore treatment combination might be necessary. Thus, the search for therapeutic alternatives with multi-target actions and greater safety and effectiveness is necessary to improve the quality of life of patients with this neurodegenerative disease (Vaz and Silvestre 2020).

Thiazolidinone is a heterocyclic ring with a sulfur atom at position 1, a nitrogen atom at position 3, and a carbonyl group at positions 2, 4, or 5. Thiazolidinone has been shown to have important biological activities such as anticancer, antidiabetic, antimicrobial, antiviral, anti-inflammatory, and anticonvulsant (Manjal et al. 2017; Jain et al. 2012). Our research group has recently demonstrated that thiazolidin-4-one has anticholinesterase activity (Da Silva et al. 2020) and is capable of improving memory and neurochemical changes in scopolamine-induced memory deficits in rats (Da Silva et al. 2021). In addition, thiazolidin-4-ones also prevent oxidative damage, alterations, cholinergic and purinergic signaling, and inflammation in

astrocytes exposed to lipopolysaccharide (Alvez et al. 2022), suggesting that these compounds are capable of modulating different brain signaling pathways.

In this context, considering the impact of AD on the lives of patients and public health, the lack of effectiveness of the currently available treatments in preventing disease progression, and the promising results obtained in brain studies with thiazolidin-4-ones, the aim of this study was therefore to evaluate the effects of 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one (DS12) in an experimental model of AD. The effects of DS12 on memory, oxidative stress parameters, and acetylcholinesterase activity in the brain structures were analyzed. Additionally, we investigated the possible toxic effects of this compound and its effects on animals through the evaluation of hematological and biochemical parameters.

2. Material and Methods

2.1 Chemicals

Streptozotocin (STZ), acetylthiocholine iodide (AcSCh), Coomassie Brilliant Blue G, ouabain, dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), and 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the detailed experiments were of analytical grade and had the highest purities. Compound 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one (DS12) was synthesized in the Laboratory of Applied Chemistry to Bioactive at the Federal University of Pelotas according to the method described by Silva et al. (2016) and was accurately identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

2.2 Animals

Two-month-old adult male Wistar rats, weighing 300–350 g, were provided by the Central Animal House of the Federal University of Pelotas. The rats were kept in cages under a standard temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), relative humidity (45–55%), and lighting (12 h light/dark cycle) conditions. The rats had *ad libitum* access to standard rodent pelleted diet and water. All animal procedures were approved by the Ethics Committee of the Federal University of Pelotas (14002-2020).

2.3 Intracerebroventricular (icv) injection of streptozotocin (STZ)

The rats were anesthetized with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). After which, the head was positioned in the stereotaxic apparatus and a midline sagittal incision was made on the scalp. The stereotaxic coordinates for the lateral ventricle were measured accurately as

anterior-posterior -0.8 mm, lateral 1.5 mm and dorso-ventral -4.0 mm relative to the bregma and ventral from the dura with the tooth bar set at 0 mm (Herman and Watson 1987). Through the skull hole, a 28-gauge Hamilton® syringe of 10 µL attached to a stereotaxic apparatus, and the syringe piston was lowered manually into each lateral ventricle. STZ was dissolved in citrate buffer (pH 4.5) and administered via bilateral intracerebroventricular (icv) injection (5 µL). The group with the control rats received an icv injection with the same volume of citrate buffer.

2.4 Treatment with compound DS12 and donepezil

The rats were divided into five experimental groups (n = 10 animals each): I, control (C); II, DS12 (10 mg/kg); III, STZ; IV, STZ + DS12 (10 mg/kg); and V, STZ + donepezil (5 mg/kg). The rats in groups III, IV, and V received bilateral icv injections of STZ, whereas those in groups I and II received only citrate buffer. Seven days after the surgical procedure, the rats in groups II and IV were treated with DS12 (10 mg/kg), and the rats in group V were orally administered donepezil (5 mg/kg). DS12 was dissolved in canola oil and administered for 20 days (Figure 1). Rats in Groups I and II received only canola oil. DS12 and donepezil doses were chosen based on previous studies from literature (Saxena et al. 2008; Da Silva et al. 2021).

2.5 Behavioral evaluation

2.5.1 Open-field test

Locomotor behavioral tests were performed using an open-field apparatus, as described previously by Pacheco et al. (2018). The open-field test was performed in an apparatus consisting of a box with the floor of the arena divided into 16 equal squares (18 cm × 18 cm) and placed in a sound-free room. The rats were placed in the rear left square and allowed to explore freely for 5 min. The number of squares crossed with all the paws (crossing) was manually counted. The apparatus was cleaned with 40% alcohol solution and dried after each rat session. This test was performed to identify motor disabilities that might influence the other behavioral tests performed.

2.5.2 Object Recognition

Twenty-four hours after the open-field test, which was also used for habituation to the apparatus, the rats underwent an object recognition test to evaluate memory. The task was performed on the 23rd day after STZ injection. The rats were individually placed in a box with two identical objects (objects A and B) for 5 min for free exploration (training). After 24 h, the rats were returned to the box for 5 min, and one of the previous objects (B) was replaced with

a novel object (object C). The time spent exploring the new and the familiar objects was recorded. The results were calculated according to the recognition index = $TC / (TA + TC)$ (Pacheco et al. 2018).

2.5.3 *Y-maze test*

Spatial recognition memory was evaluated in a three-armed apparatus: the start arm, in which rats were placed to start to explore (always open); the novel arm, which was blocked during the training session, but open during the test session; and another arm (always open). During the training session, the rat was placed in the apparatus on the start arm and was free to explore only the start arm and the other arm for five minutes. The novel arm was blocked during the training session. After three hours, the test session was performed with the novel arm open, and the rat could freely explore all three arms over a five-minute period. After each session, the apparatus was cleaned using 40% ethanol. The time spent in each arm was determined, and the results were expressed as the number of entries and time spent in each arm (Teixeira et al. 2020). Thereafter, the rats were euthanized, and the brain structures of the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum, as well as the blood were collected for analysis. Brain tissues were prepared and protein determination was performed according to each specific technique.

2.6 Acetylcholinesterase (AChE) activity

The following brain structures were homogenized on ice in a glass potter with 10 mM Tris-HCl solution (pH 7.4): cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum. Protein content was determined using the Coomassie blue method, with bovine serum albumin as the standard. AChE enzymatic assay was performed as previously described by Ellman et al. (1961). The reaction system, comprising 10 mM DTNB, 100 mM phosphate buffer (pH 7.5), and the enzyme (40–50 μ g of protein), was pre-incubated for 2 min. The reaction was then initiated by adding 0.8 mM AcSCh, and the absorbance was read on a spectrophotometer at 412 nm. All samples were tested in duplicate and enzyme activity was expressed in μ mol AcSCh/h/mg of protein.

2.7 Oxidative stress parameters

The hippocampus, cerebral cortex, cerebellum, liver, and kidneys were homogenized in 10 volumes (1:10 w/v) of sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing KCl. Homogenates were centrifuged at 3500 rpm for 10 min at 4°C. The pellet was discarded, and the supernatant was used for measurements. The samples were stored at -80°C until use. Protein content was

determined using the method described by Lowry et al. (1951), with bovine serum albumin as the standard solution.

2.7.1 *Reactive oxygen species (ROS) assay*

ROS formation was determined as previously described by Ali et al. (1992). In this assay, the oxidation of DCFH-DA to DCF (fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein) was measured to detect intracellular reactive species. DCF fluorescence intensity emission was recorded at 525 and 488 nm excitation 30 min after addition of DCFH-DA to the medium. The results are expressed as $\mu\text{mol DCF}$ per mg of protein.

2.7.2 *Total sulfhydryl content assay*

Total sulfhydryl content (SH) was determined according to the method described by Aksenov and Markesbery (2001). The samples were added to PBS buffer (pH 7.4) containing EDTA. The reaction was initiated by the addition of DTNB and incubated for 60 min in the dark. The reduction of DTNB by thiols generated a yellow derivative. The absorbance was measured spectrophotometrically at 412 nm. The results are reported as nmol TNB/mg of protein.

2.7.3 *Superoxide dismutase (SOD) activity*

The SOD activity was measured using the method described by Misra and Fridovich (1972). This assay is based on the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation of adenochrome. The intermediate in this reaction is superoxide, which is scavenged by SOD and measured using a spectrophotometer adjusted to 480 nm. The specific activity of SOD was reported in units per mg of protein.

2.7.4 *Catalase (CAT) activity*

The CAT activity was evaluated as described by Aebi (1984). The decomposition of 30 mM H_2O_2 in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) was continuously monitored using a spectrophotometer at 240 nm for 180 s at 37°C. One unit of enzyme was defined as the amount required to convert 1 nmol of hydrogen peroxide per minute. Specific CAT activity is reported as units/mg of protein.

2.8 **Biochemical parameters**

Serum glucose, cholesterol, triglyceride, and urea levels were determined using commercially available diagnostic kits supplied by Bioclin® (Bioclin MG, Brazil).

2.9 Hematological parameters

Hematological parameters were measured at the Clinical Analysis Laboratory of HCV – UFPEl. Erythrocyte counts and hemoglobin concentrations were determined using an automated counter (PocH-100iV). Hematocrit was determined using a micro-hematocrit centrifuge rotating at $19,720 \times g$ for 5 min. The mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were determined by indirect calculations.

2.10 Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test for comparison of means using GraphPad Prism version 5.0 Program (Intuitive Software for Science, São Diego, CA, USA). Differences with $P \leq 0.05$ were considered statistically significant in the analysis. All data are expressed as mean \pm standard error (SEM).

3. Results

3.1 DS12 prevents memory deficits induced by STZ

The results of the behavioral tests are shown in Figure 2. First, no significant changes were observed in locomotor activity in the open field test in any experimental group compared to the control group ($P > 0.05$), which excludes the possibility of interference of locomotor deficits in memory tasks. In the object recognition task, the percentage of exploratory preference for the new object in the STZ group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$), indicating memory impairment. Treatment with DS12 (10 mg/kg), as well as treatment with donepezil (5 mg/kg), increased the percentage of exploratory preference of the new object when compared to the STZ group ($P < 0.001$ for DS12 and $P < 0.01$ for donepezil), demonstrating that DS12 is able to restore memory deficits induced by this experimental model (Figure 2B). In the Y-maze test, STZ also decreased the time spent ($P < 0.01$, Figure 2C) and the number of entries ($P < 0.001$; Figure 2D) on the new arm. Treatment with DS12 (10 mg/kg) effectively attenuated the spatial memory deficits, showing results similar to those of standard donepezil (5 mg/kg).

3.2 DS12 prevented AChE activity alterations induced by STZ administration in cerebral cortex and hippocampus

As shown in figure 3, STZ induced a significant increase in AChE activity in the cerebral cortex and hippocampus ($P < 0.05$), and DS12 (10 mg/kg) and donepezil (5 mg/kg)

treatment prevented this enzyme alteration ($P < 0.001$). Regarding AChE activity in the cerebellum, no significant differences were observed in rats in the STZ group compared to the control (Figure 3). However, treatment with donepezil caused a decrease in enzyme activity compared to that in the STZ group ($P < 0.001$). DS12 alone or in combination with STZ treatment did not alter AChE activity in the cerebellum ($P > 0.05$, Figure 3).

3.3 DS12 prevents oxidative damage induced by STZ administration

In relation to oxidative stress parameters, our results showed an increase in ROS levels in the hippocampus, cerebral cortex, and cerebellum of rats in the STZ group when compared to the control group (Figure 4 A, B, and C, $P < 0.05$). Treatment with DS12 (10 mg/kg) prevented the increase in ROS levels in all evaluated brain structures ($P < 0.05$). Our findings also showed a decrease in ROS levels in the brains of rats treated with donepezil (5 mg/kg) (Figure 4 A, B, and C, $P < 0.05$). DS12 *per se* did not alter ROS levels under these experimental conditions. Additionally, no significant changes were observed in SH levels in the hippocampus, cerebral cortex, and cerebellum in any of the groups evaluated (Figure 4 D, E, and F $P > 0.05$).

The results of antioxidant enzyme activities are shown in Figure 5 and 6. SOD activity in the hippocampus was increased in the STZ group ($P < 0.05$) compared to that in the control group. Neither DS12 nor donepezil treatments were capable of preventing SOD enzyme alterations in the hippocampus (Figure 5). In contrast, an increase in SOD activity was observed only in STZ animals treated with DS12 and donepezil in the cerebral cortex (Figure 5). No significant changes were observed in the SOD activity in the cerebellum of any of the groups evaluated (Figure 5, $P > 0.05$). A decrease in CAT activity was observed in the STZ group in the hippocampus and cerebral cortex of STZ group when compared to the control group (Figure 6 F $P < 0.05$). However, DS12 and donepezil treatments were effective in preventing alterations in brain antioxidant enzymes in the hippocampus and cerebral cortex when compared to the STZ group (Figure 6). In addition, no significant changes were observed in catalase activity in the cerebellum of any of the groups evaluated (Figure 6).

3.4 DS12 treatment did not alter biochemical and hematological parameters

The results of the biochemical analyses are presented in Table 1. Regarding biochemical parameters, no significant changes were observed in glucose, triglycerides, cholesterol, and urea, and in any of the groups evaluated in this study ($P > 0.05$). With regard to hematological parameters, neither STZ nor STZ associated with DS12 or donepezil treatment induced significant changes in the following counts: platelets, lymphocytes, monocytes,

basophils, eosinophils, red blood cells, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume (MCV), mean cellular hemoglobin concentration (CHCM), total plasma protein, fibrinogen, and leukocytes (Table 2).

4. Discussion

Intracerebroventricular injection of STZ in rodents has been shown to produce dysfunctions in cholinergic signaling, neuroinflammation, oxidative stress, insulin resistance, and changes in glucose metabolism, similar to those described in the brains of AD patients. In this regard, STZ-induced sporadic dementia Alzheimer type is considered a valid experimental model for the study of early pathophysiological changes in this neurodegenerative disease (Kamat 2015).

Here, we showed that brain injection of STZ induced memory impairment in rats, which were observed in behavioral tasks, such as object recognition and the y-maze. Although desensitization of the cerebral insulin receptor and metabolic abnormalities in cerebral oxidative glucose are considered the main causes of STZ-induced memory impairment (Henneberg and Hoyer 1995), previous studies from research group have shown that other mechanisms, such as oxidative stress, alterations in genes and activities of cholinergic enzymes, disturbances in ion pump activities, neurotrophic factors, and adenosinergic signaling also contribute to memory deficits induced by STZ (Gutierrez et al. 2014; Pacheco et al. 2018; Teixeira et al. 2020; Teixeira et al. 2022).

Our results showed that DS12 treatment improved memory similar to donepezil. In another study, we also demonstrated that previous administration of DS12 (5 and 10 mg/kg) for seven days was capable of preventing the amnesic effects induced by scopolamine in inhibitory avoidance tasks, which can be associated with the anticholinesterase action of this compound (Da Silva et al. 2021).

The association between cholinergic signaling dysfunction and memory decline in patients with AD (Chen et al. 2022). Similar to other studies that used the STZ model for induced sporadic dementia of the Alzheimer type (Pacheco et al. 2018); here we also demonstrated an increase in AChE activity in the cerebral cortex and hippocampus. AChE is responsible for rapid degradation of the neurotransmitter acetylcholine into acetate and choline (Chen et al. 2022). Considering that acetylcholine is involved in mechanisms associated with memory and learning, an increase in AChE activity may lead to a decrease in neurotransmitter levels in the brain, contributing to memory deficits. Additionally, the presence of AChE has been associated with increased neurotoxicity of amyloid components (Talesa 2001). Based on

this, the most successful therapeutic strategies for AD treatment are drugs capable of inhibiting AChE activity, such as donepezil (Marucci et al. 2021). Donepezil is considered the first-line treatment for patients with mild to moderate AD and is a highly selective reversible AChE inhibitor that exhibits a good pharmacological profile in relation to cognitive improvement (Jia et al. 2020; Marucci et al. 2021). However, adverse effects have also been associated with its use (Dun et al. 2020).

Our findings showed that DS12 prevented alterations in AChE activity in a manner similar to donepezil. Data from literature using molecular docking analysis have suggested a good overlap of thiazolidinones with the active site of AChE, similar to the neurotransmitter's acetylcholine and donepezil (Da Silva et al., 2020). In fact, we recently demonstrated that DS12 is a mixed inhibitor capable of inhibiting *in vitro* the activity of AChE total as well as the isoforms G1 and G4 of the cerebral cortex and hippocampus (Da Silva et al. 2020). Moreover, DS12 (5 and 10 mg/kg) administered orally for seven days also improved memory and prevented alterations in AChE activity induced by scopolamine in the cerebral cortex, hippocampus, and lymphocytes (Da Silva et al., 2021). Taken together, these findings suggest that the anticholinesterase action of DS12 is an important mechanism associated with the improved memory observed in other studies, as well as in the model of memory dysfunction used here.

Furthermore, DS12 was able to prevent alterations in oxidative stress in brain structures. It is well established that the administration of STZ causes oxidative damage in the brain (Huang et al. 2016; Kheradmand et al. 2018; Pacheco et al. 2018, Teixeira et al. 2020). Oxidative stress is considered an important mechanism in AD development and progression because it is associated with mitochondrial dysfunction, neuroinflammation, A β accumulation, and tau hyperphosphorylation, leading to subsequent loss of synapses and neurons and memory deficits (Dias-Santagata et al. 2007; Chen and Zhong 2014). Thus, compounds with antioxidant activities may be useful for AD treatment. The antioxidant potential of thiazolidin-4-one derivatives has been reported previously (El nezhawy et al. 2009; Apotrosoaei et al. 2014). Lopez et al. showed that 3-(3-(diethylamino)propyl)-2-(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one prevented the increase in ROS, nitrite, and IL-6 levels, and alterations in antioxidant enzymes in astrocyte cultures exposed to lipopolysaccharide (Lopez et al. 2022). Most importantly, DS12 also prevented the increase in ROS levels and decrease in superoxide dismutase activity in the cerebral cortex and hippocampus in a model of scopolamine-induced amnesia (Da Silva et al., 2021). Although it is not possible to determine the exact mechanism involved in the antioxidant activity of DS12, we suggest that the increase in superoxide dismutase and catalase activities

by this compound can contribute to the clearance of free radicals, preserving brain function and memory.

The antioxidant effects of DS12 are similar to those of donepezil. Previous studies demonstrated that donepezil has *in vitro* antioxidant effects with radical scavenging activity similar to that of vitamin C (Munishamappa et al. 2018) capable also to inhibiting quinonilic acid and Fe²⁺-induced lipid peroxidation in the rat brain (Oboh et al. 2017). Acetylcholine has been shown to reduce ROS levels, attenuate cell apoptosis and mitochondrial dysfunction, and enhance the protein expression and activity of SOD1 and SOD2 induced by hypoxia/reoxygenation in cultured rat cardiomyoblasts (Sun et al. 2014). These findings suggest to role in modulating oxidative stress. Thus, a compound with dual action, such as DS12, capable of increasing acetylcholine levels and acting as an antioxidant, is an important aspect to consider in AD neuroprotection.

The hippocampus and cerebral cortex are brain regions that are involved in memory and other cognitive abilities (Preston and Eichenbaum 2013). In fact, alterations in the structure and function of the hippocampus and cerebral cortex have been well documented in the literature in both AD patients and experimental models (Mullart et al. 1990; Pacheco et al. 2018; Teixeira et al. 2020; Gaunitz et al. 2021; Teixeira et al. 2022). Although the cerebellum has been less studied in relation to AD, previous studies have shown that this structure has many pathological changes, such as microglial reactive, diffuse, and amyloid deposits, dystrophic neurites, and neurovascular dysfunction that may contribute to DA progression (Larner 1997; Jacobs et al. 2017; Singh-Bains et al. 2019). Thus, in our study, we also evaluated neurochemical changes in the cerebellum, but only an increase in ROS levels was observed in the AD model used here.

Finally, it is important to note that DS12 administered orally for 20 days did not alter the glucose, triglyceride, total cholesterol, and urea levels in the serum of the animals, which is consistent with previously published results (Da Silva et al. 2021). In addition, DS12 did not alter erythrogram and leukogram parameters, suggesting that the time and dosage of DS12 were well tolerated by the animals and did not cause toxic effects.

In conclusion, treatment with DS12 prevented the alterations in memory, AChE, and oxidative damage induced by STZ in a manner similar to that of donepezil. Our results provide evidence that DS12 may be a promising compound for the prevention of brain alterations associated with AD. Further studies need to be conducted to evaluate other mechanisms involved in the neuroprotective effects of this compound.

5. References

Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)

Aksenov MY, Markesbery WR (2011) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141–145. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01636-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01636-6)

Ali SF, LeBel CP, Bondy SC (1992) Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* 13:637–648.

Alvez FL, Bona NP, Pedra NS, da Silva DS, Cunico WJ, Stefanello FM, de Andrade CM, Soares MSP, Spanevello RM (2022) Effect of Thiazolidin-4-one Against Lipopolysaccharide-Induced Oxidative Damage, and Alterations in Adenine Nucleotide Hydrolysis and Acetylcholinesterase Activity in Cultured Astrocytes. *Cell Mol Neurobiol*. [https://doi:10.1007/s10571-021-01177-1](https://doi.org/10.1007/s10571-021-01177-1).

Apotrosoaei M, Vasincu I, Constantin S, Buron F, Routier S, Profire L (2014) Synthesis, characterization and antioxidant activity of some new thiazolidin-4-one derivatives. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 118:213-218.

Bitencourt EM, Kuerten CMX, Budny J, Tuon T (2019) Alzheimer's disease: pathophysiological aspects, quality of life, therapeutic strategies of physical therapy and biomedicine. *Rev Inova Saúde* 8(2):138-157. <http://dx.doi.org/10.18616/inova.v8i2.3573>

Chen Z, Huang J, Yang S, Hong F (2022) Review Role of Cholinergic Signaling in Alzheimer's Disease. *Molecules* 27: 1816. <https://doi.org/10.3390/molecules27061816>

Chen Z, Zhong C (2014) Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull* 30: 271–281. <http://doi.org/10.1007/s12264-013-1423-y> 271

Da Silva DS, da Silva CEH, Soares MSP, Azambuja JH, de Carvalho TR, Zimmer GC, Frizzo CP, Braganhol E, Spanevello RM, Cunico W (2016). Thiazolidin-4-ones from 4-(methylthio) benzaldehyde and 4-(methylsulfonyl) benzaldehyde: synthesis, antiglioma activity and cytotoxicity. *Eur J Med Chem* 124:574-582. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.057>.

Da Silva DS, Soares MSP, Martini F, Pesarico AP, de Mattos BDS, de Souza AA, da Silva CEH, Scaini JLR, Machado KDS, Wayne Nogueira C, Spanevello RM, Cunico W (2020) In

vitro effects of 2-{4-[methylthio (methylsulfonyl)] phenyl}-3-substitutedthiazolidin-4-ones on the acetylcholinesterase activity in rat brain and lymphocytes: isoform selectivity, kinetic analysis, and molecular docking. *Neurochem Res* 45:241-253. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02929-8>.

Da Silva DS, Soares MSP, Teixeira FC, De Mello JE, De Souza AA, Luduvico KP, De Andrade CM, Spanevello RM, Cunico W (2021) Multitarget Effect of 2-(4-(Methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one in a Scopolamine-Induced Amnesic Rat Model. *Neurochem Res* 46: 1554–1566. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03295-0>

Dias-Santagata D, Fulga TA, Duttaroy A, Feany MB (2007) Oxidative stress mediates tau-induced neurodegeneration in *Drosophila*. *J Clin Invest* 117: 236–245

Dubois B, Hampel H, Feldman HH, Scheltens P, Aisen P, Andrieu S, Bakardjian H, Benali H, Bertram L, Blennow K, Broich K, Cavado E, Crutch S, Dartigues JF, Duyckaerts C, Epelbaum S, Frisoni GB, Gauthier S, Genthon R, Gouw AA, Habert MO, Holtzman DM, Kivipelto M, Lista S, Molinuevo JL, O'Bryant SE, Rabinovici GD, Rowe C, Salloway S, Schneider LS, Sperling R, Teichmann M, Carrillo MC, Cummings J, Jack CR Jr (2016) Preclinical Alzheimer's disease: definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimer's Disease and Other Dementias* 12(3):292-323. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.002>

Dun N, Pearce G, Shakir W (2020) Adverse effects associated with the use of donepezil in general practice in England. *J Psychopharm* 14: 406–408

El nezhawy A, Ramla M, Khalifa N, Abdulla M (2009) Synthesis and antioxidant activity of some thiazolidin-4-one derivatives. *Monatshefte Fur Chemie - MONATSH CHEM.* 140: 531-539. <http://doi.org/10.1007/s00706-008-0085-3>

Ellman G, Courtney K, Andres V, Featherstone R (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 17:88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

Gaunitz S, Tjernberg LO, Schedin-Weiss S (2021) The N-glycan profile in cortex and hippocampus is altered in Alzheimer disease. *J Neurochem* 159: 292-304. <https://doi.org/10.1111/jnc.15202>.

Gemelli T, Andrade RB, Castro AL, Garcia LP, Funcha C (2013) Oxidative stress as an important factor in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Braz Multidiscip J* 16:67-78. <https://doi.org/10.25061/2527-2675/ReBraM/2013.v16i1.43>

Gutierrez JM, Carvalho FB, Schetinger MR, Marisco P, Agostinho P, Rodrigues M, Rubin MA, Schmatz R, da Silva CR, de P Cognato G, Farias JG, Signor C, Morsch VM, Mazzanti CM, Bogo M, Bonan CD, Spanevello R (2014) Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. *Life Sci* 96:7–17. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.11.014>

Henneberg N, Hoyer S (1995) Desensitization of the neuronal insulin receptor: a new approach in the etiopathogenesis of late-onset sporadic dementia of the Alzheimer type (SDAT)? *Arch Gerontol Geriatr* 21: 63-74. [https://doi.org/10.1016/0167-4943\(95\)00646-3](https://doi.org/10.1016/0167-4943(95)00646-3).

Huang WJ, Zhang X, Chen WW (2016) Role of oxidative stress in Alzheimer's disease (review). *Biomed Rep* 4:519–522. <https://doi.org/10.3892/br.2016.630>

Jacobs H, Hopkins D, Maryhofer H, Bruner E, Leeuwen F, Raaijmakers W, Schmähmann J (2018) The cerebellum in Alzheimer's disease: evaluating its role in cognitive decline. *Brain*

Jacobs HL, Hopkins D, Mayrhofer H, Bruner E, Leewen F, Raaijmarkers W, Schmähmann JT (2018) The cerebellum in Alzheimer's disease: evaluating its role in cognitive decline. *Brain* 141: 37–47. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Jain AK, Vaidya A, Ravichandran V, Kashaw SK, Agrawal RK (2012) Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: A review. *Bioorg Med Chem* 20:3378-3395. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.03.069>

Jia J, Wei C, Chen W, Jia L, Zhou A, Wang F, Tang Y, Xu L (2020) Safety and Efficacy of Donepezil 10 mg/day in Patients with Mild to Moderate Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 74:199-211. <https://doi: 10.3233/JAD-190940>.

Kamat P (2015) Streptozotocin induced Alzheimer's disease like changes and the underlying neural degeneration and regeneration mechanism. *Neural Regen Res* 10: 1050–1052. <https://doi.org/ 10.4103/1673-5374.160076>

Kheradmand E, Hajizadeh Moghaddam A, Zare M (2018) Neuroprotective effect of hesperetin and nano-hesperetin on recognition memory impairment and the elevated oxygen stress in rat

model of Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother* 97:1096-1101. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.047>

Larner A.J. (1997) The Cerebellum in Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 8:203–209. <https://doi.org/10.1159/000106632>

López LA, Fernando AC, Lazarova Z, Bañuelos VR, Sánchez RSH (2012). Antioxidants, a paradigm for diseases treatment. *Anacem J. [Internet Magazine]* 6:48-53.

Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.

Manjal SK, Kaur R, Bathia R, Kumar K, Singh V, Shankar R, Kaur R, Rawal RK (2017) Synthetic and medicinal perspective of thiazolidinones: a review. *Bioorg Chem* 75:406–423. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.10.014>

Maruccia G, Buccionia M, DalBena D, Lambertuccia C, Volpinia R, Amentab F (2021) Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 190: 108352. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108352>.

Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170–3175.

Mullaart E, Boerrigter ME, Ravid R, Swaab DF, Vijg, J (1990) Increased levels of DNA breaks in cerebral cortex of Alzheimer's disease patients *Neurobiol Aging* 11: 169-173. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(90\)90542-8](https://doi.org/10.1016/0197-4580(90)90542-8).

Munishamappa V, Seethalakshmi, Vijayakumar AE, Rajathilagam T (2019) Evaluation of the antioxidant activity of donepezil - in vitro study *Natl J Physiol Pharm Pharmacol* 9: 108-110.

Oboh G, Ogunsuyi OB, Olonisola OF (2017) Does caffeine influence the anticholinesterase and antioxidant properties of donepezil? Evidence from in vitro and in vivo studies *Metab Brain Dis* 32:629-639. <http://doi.org/10.1007/s11011-017-9951-1>.

Pacheco SM, Soares MSP, Gutierrez JM, Gerzson MFB, Carvalho FB, Azambuja JH, Schetinger MRC, Stefanello FM, Spanevello RM (2018) Anthocyanins as a potential pharmacological agent to manage memory deficit, oxidative stress and alterations in ion pump activity induced by experimental sporadic dementia of Alzheimer's type. *J Nutr Biochem* 56:193–204. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.02.014>

- Preston A, Eichenbaum H (2013) Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Curr Biol* 23: R764–R773 <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.041>
- Price JL, Ko A, Wade MJ, Tsou SK, McKell DW, Morris JC (2001) Neuron Number in the Entorhinal Cortex and CA1 in Preclinical Alzheimer Disease. *Arch Neurol* 58:1395-1402. <https://doi.org/10.1001/archneur.58.9.1395>
- Rodríguez-Méndez AJ, Carmen-Sandoval W, Lomas-Soria C, Guevara-González RG, Reynoso-Camacho R, Villagran-Herrera ME, Salazar-Olivo L, Torres-Pacheco I, Feregrino-Pérez AA (2018) Timbe (*Acaciella angustissima*) pods extracts reduce the levels of glucose, insulin and improved physiological parameters, hypolipidemic effect, oxidative stress and renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecules* 23:2812. <https://doi.org/10.3390/molecules23112812>
- Santos KRS, Barbosa V, Lemos LR, de Andrade AE (2020). Characteristic aspects of neuropathy in patients with Alzheimer's disease. *REBIs* 2:70-76.
- Saxena G, Singh SP, Agrawal R, Nath C. (2008) Effect of donepezil and tacrine on oxidative stress in intracerebral streptozotocin-induced model of dementia in mice. *Eur J Pharmacol* 581(3):283-9. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.12.009>.
- Sereniki A, Vital MABF (2008) Alzheimer's disease: pathophysiological and pharmacological features. *Rev Psiquiatr Rio Gd Sul* 30(1). <https://doi.org/10.1590/s0101-81082008000200002>
- Singh-Bains MK, Linke V, Austria MDR, Tan A, Scotter E, Mehrabi N, Faull F, Dragunow M (2019) Altered microglia and neurovasculature in the Alzheimer's disease cerebellum. *Neurobiol Dis* 132:104589. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104589>.
- Talesa, VN (2021) Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* 122: 1961-1969. [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(01\)00309-8](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(01)00309-8).
- Teixeira FC, Gutierrez JM, Soares MSP, da Siveira de Mattos B, Spohr L, do Couto CAT, Bona NP, Assmann CE, Morsch VM, da Cruz IBM, Stefanello FM, Spanevello RM (2020) Inosine protects against impairment of memory induced by experimental model of Alzheimer disease: a nucleoside with multitarget brain actions. *Psychopharmacology* 237(3):811-823. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05419-5>

Teixeira FC, Soares MSP, Blödorn EB, Domingues WB, Reichert KP, Zago AM, Carvalho FB, Gutierrez JM, Gonçalves RA, da Cruz Fernandes M, Campos VF, Chitolina MR, Stefanello FM, Spanevello RM (2022) Investigating the Effect of Inosine on Brain Purinergic Receptors and Neurotrophic and Neuroinflammatory Parameters in an Experimental Model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 59(2):841-855. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02627-z>

Trevisan K, Cristina-Pereira R, Silva-Amaral D, Aversi-Ferreira TA (2019) Theories of Aging and the Prevalence of Alzheimer's Disease. *BioMed Res Int* . <https://doi.org/10.1155/2019/9171424>

Vaz M, Silvestre S (2020). Alzheimer's disease: recent treatment strategies. *Eur J Pharmacol* 887:173554. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173554>

Yiannopoulou K, Papageorgiou S (2020) Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update *J Cent Nerv Syst Dis* 12: 1179573520907397. [https://doi: 10.1177/1179573520907397](https://doi.org/10.1177/1179573520907397)

Zun L, Zang W, Zhao M, Yu X, He X, Miao Y, Zhou Z (2014) Acetylcholine Promotes ROS Detoxification Against Hypoxia/reoxygenation-Induced Oxidative Stress Through FoxO3a/PGC-1 α Dependent Superoxide Dismutase. *Cell Physiol Biochem* 34:1614-1625. <https://doi.org/10.1159/000366364>

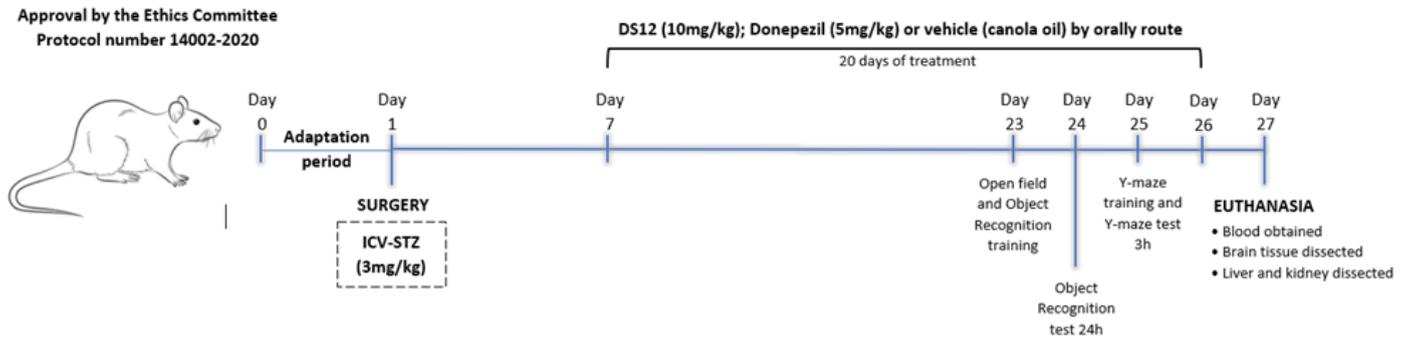


Figure 1 - Scheme of the protocol used to induce the experimental model of sporadic dementia of Alzheimer's type in rats and treatment with 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one (DS12) and donepezil (DON) orally administered for 20 days.

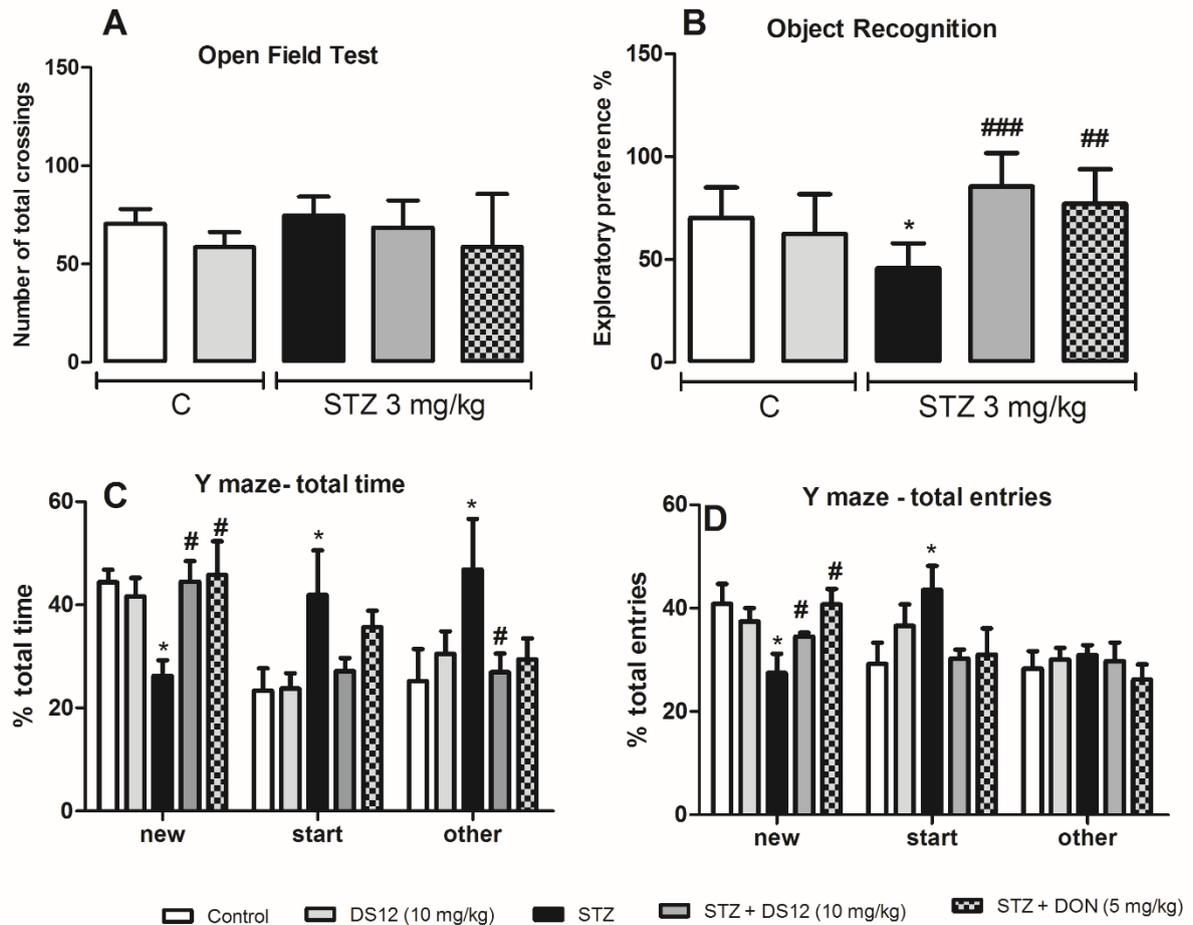


Figure 2 - Effect of 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one (DS12 10 mg/kg) and donepezil (DON 5 mg/kg) on locomotor activity evaluated by open-field task (A) and memory evaluated by object recognition (B) and Y-maze test in time (C) and number of entries in each arm (D) of rats submitted to experimental model of sporadic dementia of Alzheimer's type induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin (STZ 3 mg/kg). * $P < 0.05$ when compared with the control group and # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ when compared with the STZ group (n= 8-10 rats per group).

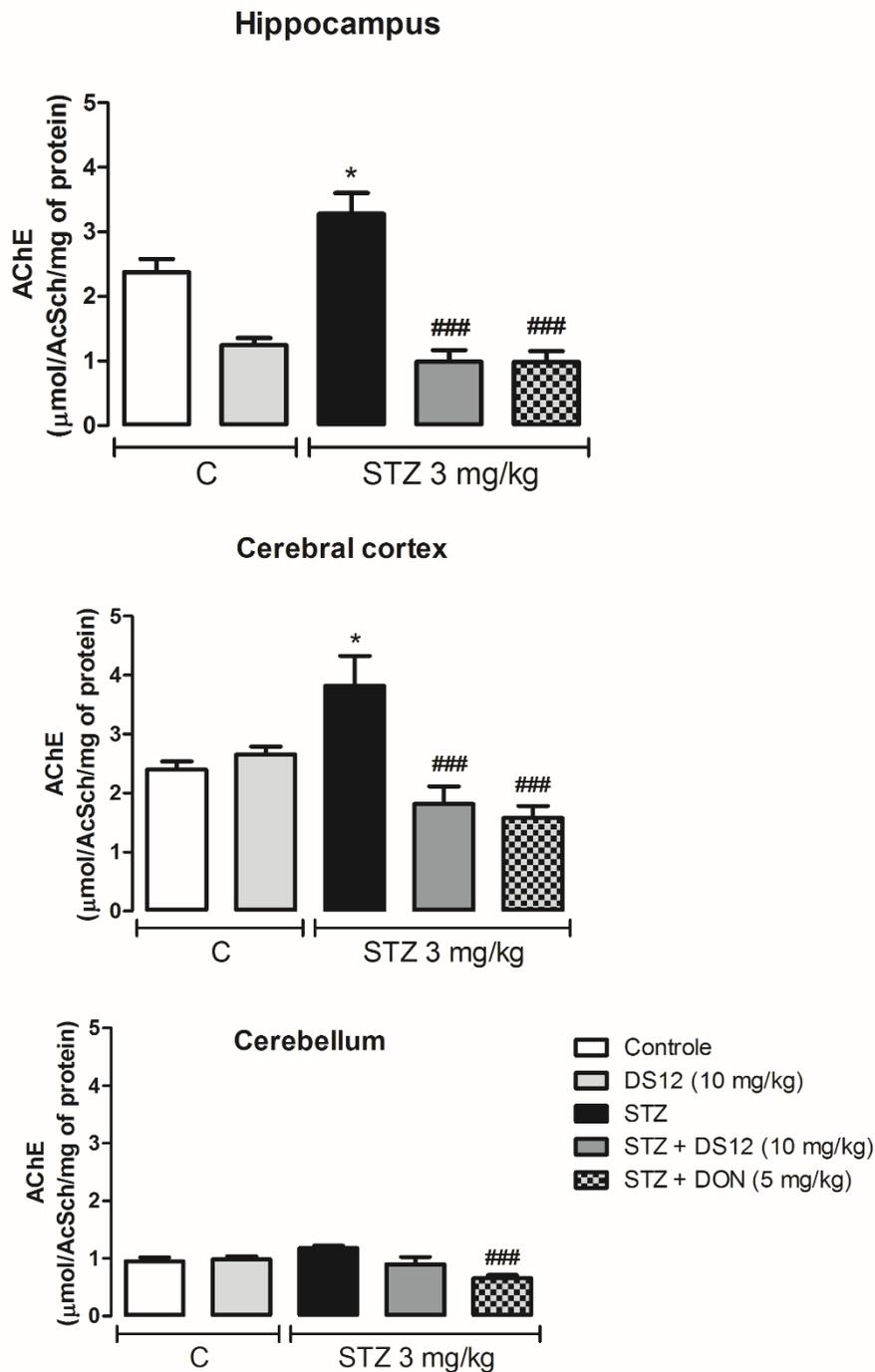


Figure 3 - Effect of 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one (DS12 10mg/kg) and donepezil (DON 5mg/kg) treatment on acetylcholinesterase (AChE) activity of hippocampus, cerebral cortex and cerebellum of rats submitted to experimental model of sporadic dementia of Alzheimer's type induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin (STZ 3 mg/kg). (3 mg/kg). * $P < 0.05$ when compared to the control group. ### $P < 0.001$ when compared to STZ group (n = 05 rats per group).

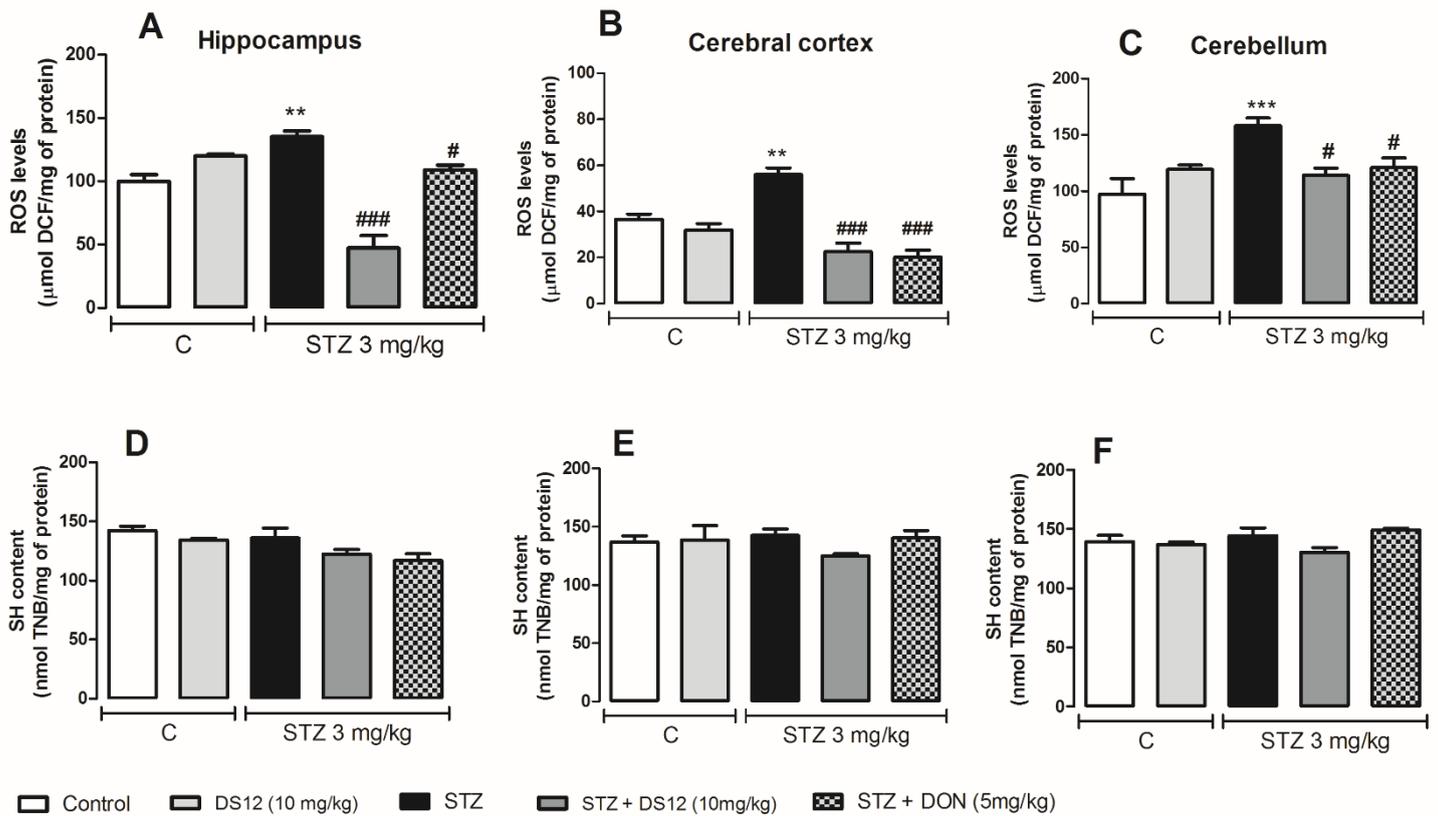


Figure 4 - Effect of 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one (DS12 10mg/kg) and donepezil (DON 5mg/kg) treatment on reactive oxygen species (ROS) levels in hippocampus (A), cerebral cortex (B) and cerebellum (C) and total sulfhydryl content (SH) in hippocampus (D), cerebral cortex (E) and cerebellum (F) in rats submitted to experimental model of sporadic dementia of Alzheimer's type induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin (STZ 3 mg/kg). ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ when compared to the control group. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ when compared to STZ group (n = 05 rats per group).

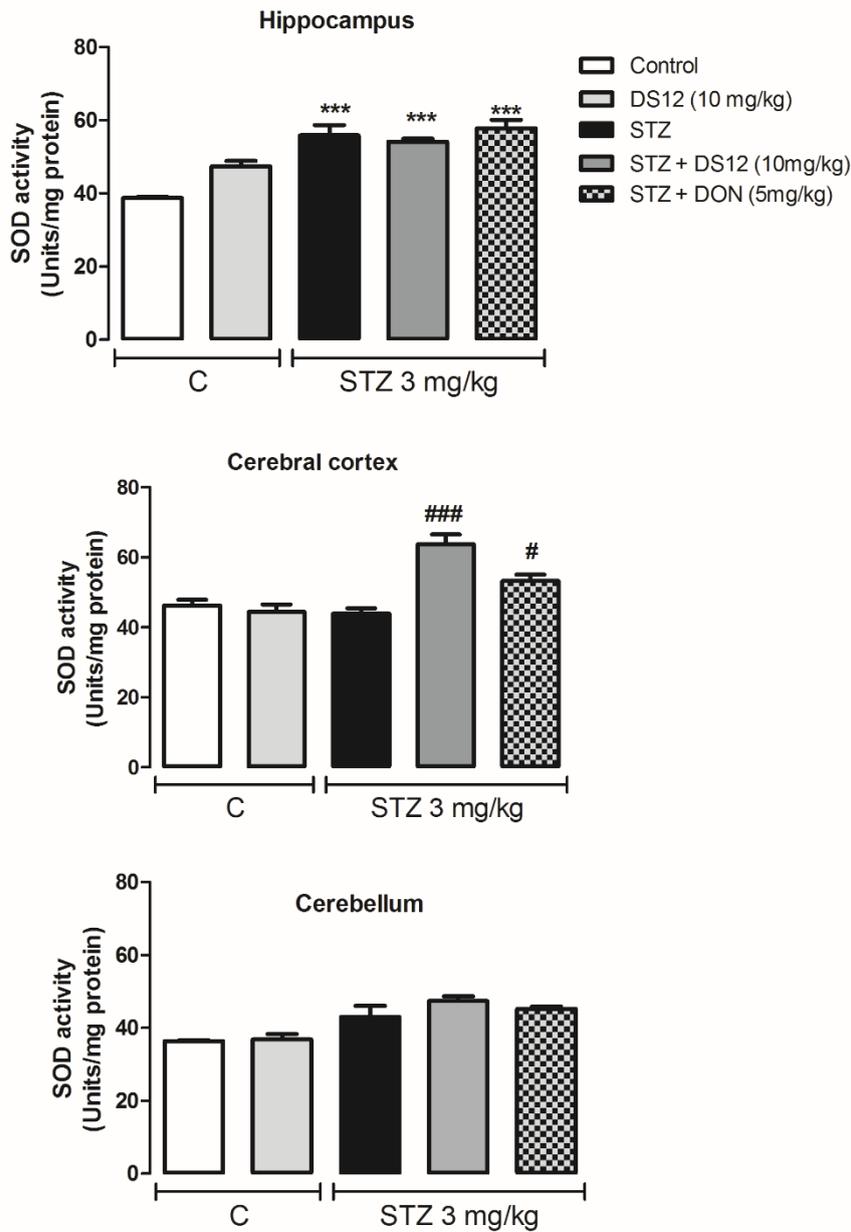


Figure 5 - Effect of 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one (DS12 10mg/kg) and donepezil (DON 5mg/kg) on superoxide dismutase (SOD) activity (SOD) in hippocampus, cerebral cortex and cerebellum in rats submitted to experimental model of sporadic dementia of Alzheimer's type induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin (STZ 3 mg/kg). *** $P < 0.001$ when compared to the control group. # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ when compared to STZ group (n = 05 rats per group).

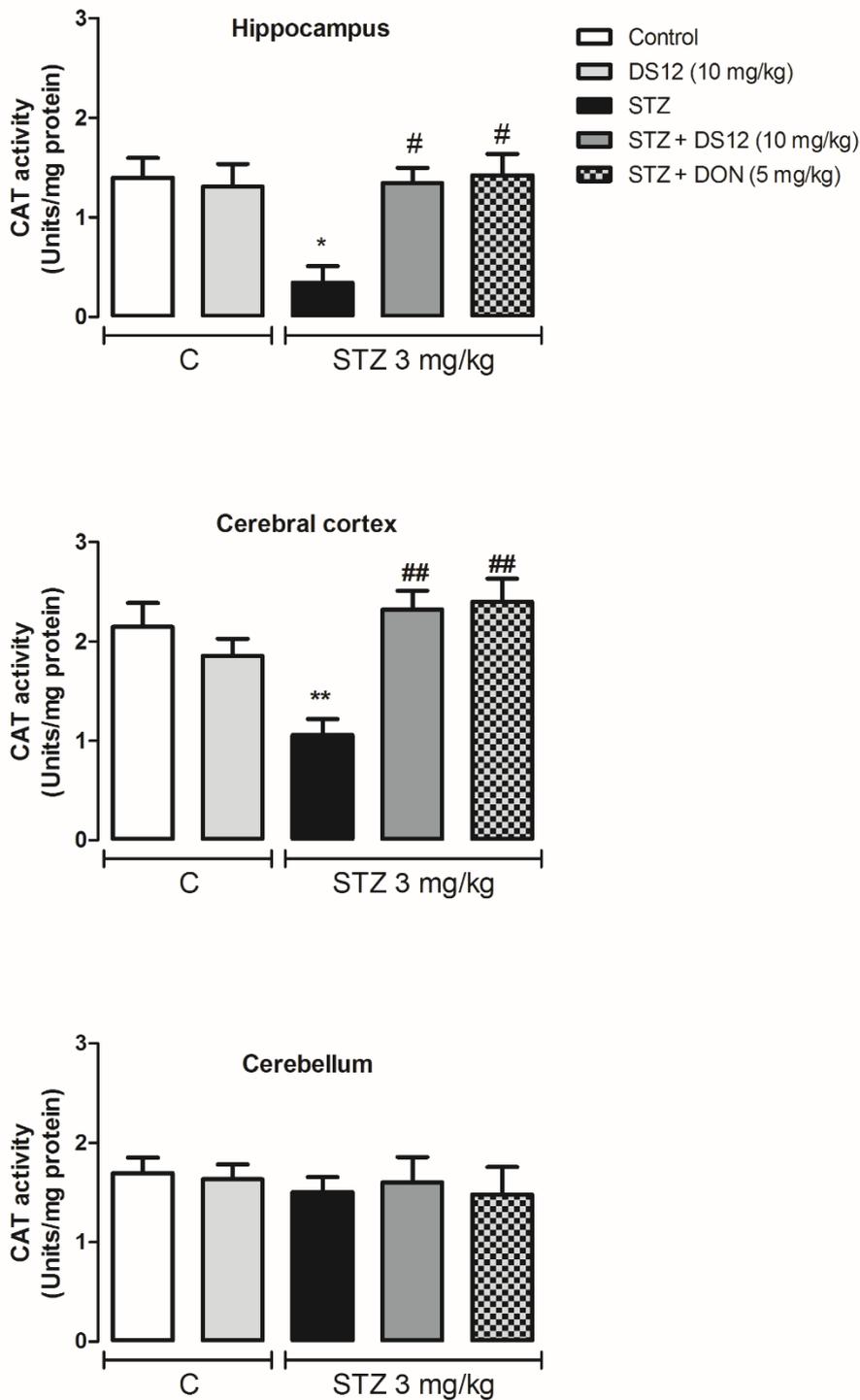


Figure 6 - Effect of 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one (DS12 10mg/kg) and donepezil (DON 5mg/kg) on catalase (CAT) activity (CAT) in hippocampus, cerebral cortex and cerebellum in rats submitted to experimental model of sporadic dementia of Alzheimer's type induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin (STZ 3 mg/kg). *P < 0.05 and **P < 0.01 when compared to the control group. #P < 0.05, ##P < 0.01 when compared to the STZ group (n = 04-05 rats per group).

Table 1- Effects of treatment with 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one (DS12 10 mg/kg) and donepezil (DON 5mg/kg) on levels of glucose, triglycerides, cholesterol and urea in the serum of rats submitted to experimental model of sporadic dementia of Alzheimer's type induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin (STZ 3 mg/kg). Results are expressed in mg/dL. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc multiple comparisons test was used. Values are expressed as mean \pm S.E.M (n= 05 rats each group).

	Control	DS12	STZ	STZ + DS12	STZ+DON
Glucose	179.42 \pm 43.98	237.27 \pm 44.34	206.79 \pm 40.22	206.94 \pm 26.09	191.84 \pm 25.21
Total Cholesterol	97.84 \pm 30.16	125.54 \pm 24.52	101.95 \pm 24.91	113.96 \pm 17.16	121.32 \pm 15.22
Triglycerides	155.22 \pm 54.80	104.58 \pm 50.05	103.94 \pm 31.23	156.41 \pm 73.66	113.92 \pm 35.15
Urea	56.29 \pm 6.22	55.61 \pm 9.12	59.51 \pm 16.80	66.41 \pm 2.77	45.53 \pm 12.27

Table 2 - Effects of treatment with 2-(4-(methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one (DS12 – 10mg/kg) and donepezil (DON – 5mg/kg) on hematological parameters in blood of rats submitted to experimental model of sporadic dementia of Alzheimer's type induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin (STZ 3 mg/kg). MCV (Mean Corpuscular Volume) and MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration). One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc multiple comparisons. Values are expressed as mean \pm SEM (n= 06 rats each group).

	Control	DS12	STZ	STZ+DS12	STZ+DON
Platelets (x10³/μL)	955.0 \pm 159.36	1069.57 \pm 54.83	1113.50 \pm 102.19	1081.00 \pm 110.18	1039.0 \pm 88.08
Red blood cells (x10⁶/μL)	9.16 \pm 0.43	9.18 \pm 0.23	8.95 \pm 0.36	8.81 \pm 0.70	8.90 \pm 0.53
Hemoglobin (g/dL)	16.1 \pm 0.98	16.01 \pm 0.65	16.30 \pm 0.51	16.04 \pm 1.63	15.98 \pm 0.86
Hematocrit (%)	51.3 \pm 2.24	50.99 \pm 1.87	48.80 \pm 1.95	48.32 \pm 4.50	47.92 \pm 2.23
VCM (fL)	56.22 \pm 0.97	55.06 \pm 1.17	54.45 \pm 0,50	53.30 \pm 0.55	53.70 \pm 1.71
CHCM (%)	30.83 \pm 0.66	31.39 \pm 0.26	32.80 \pm 0.62	33.18 \pm 0.53	32.78 \pm 0.40
Total protein (g/dL)	7.4 \pm 0.24	7.10 \pm 0.34	7.40 \pm 0.33	7.00 \pm 0.37	7.0 \pm 0.42
Fibrinogen (mg/dL)	280.0 \pm 50.0	244.44 \pm 123.60	300.00 \pm 132.92	340.00 \pm 134.16	266.67 \pm 150.55
Total leukocytes (x10³/μL)	5050.0 \pm 1034.41	6637.50 \pm 1088.82	5300.00 \pm 2174.09	5775.0 \pm 2220.17	4666.67 \pm 1167.33
Lymphocytes (x10³/μL)	4564.2 \pm 1246.72	5165.13 \pm 746.44	5320.00 \pm 1394.55	4787.75 \pm 1894.45	3847.7 \pm 1079.57
Monocytes (x10³/μL)	34.83 \pm 55.35	80.88 \pm 64.76	149.50 \pm 119.44	70.80 \pm 52.76	53.00 \pm 73.83
Eosinophils (x10³/μL)	63.0 \pm 62.72	28.43 \pm 35.91	0 \pm 36.33	35.40 \pm 39.53	14.33 \pm 35.11
Basophiles (x10³/μL)	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0

4 Discussão

No presente estudo avaliou-se os efeitos da administração do composto DS12 em prevenir déficits de memória e alterações neuroquímicas em um modelo experimental de DA induzido por STZ. Neste protocolo experimental foram avaliadas alterações neuroquímicas em três estruturas cerebrais: hipocampo, córtex cerebral e cerebelo. Hipocampo e córtex cerebral são estruturas amplamente avaliadas em modelos de DA, pois são algumas das estruturas mais prejudicadas com o avanço da doença. No entanto, consideramos relevante a análise dos impactos neuroquímicos causados pela administração de STZ e pelo tratamento do estudo no cerebelo, dada a densidade neuronal desta estrutura.

Primeiramente foi demonstrado que a injeção intracerebroventricular de STZ induziu déficit de memória, estresse oxidativo e disfunção colinérgica nos animais. A administração de STZ induziu um aumento na atividade da AChE em córtex cerebral e hipocampo indicando prejuízos na transmissão colinérgica característicos da DA (Araújo, Santos e Gonsalves, 2016; Bassani et al., 2018). Cabe ressaltar que nestas estruturas cerebrais os tratamentos com DS12 e DON causaram uma redução na atividade da AChE. Esse efeito do composto em DS12 em inibir a atividade da AChE pode contribuir para um aumento dos níveis e tempo de ação do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica o que poderia explicar a melhora da memória dos animais. Esses resultados corroboram com dados prévios do nosso grupo de pesquisa que demonstram o potencial anticolinesterásico do composto de DS12 através de estudo *in vitro*, *in vivo* e de modelagem molecular (Da Silva et al., 2020; 2021).

As análises de estresse oxidativo demonstraram um aumento nos níveis de ROS no grupo STZ em todas as estruturas cerebrais analisadas, o que pode ter prejudicado determinadas funções cerebrais dos animais deste grupo, como memória e cognição (Teixeira et al., 2020; Da Silva et al., 2021). Os tratamentos com DS12 e DON mostraram-se capazes de reverter esse dano oxidativo em todas as estruturas cerebrais analisadas, permitindo-nos concluir que as alterações causadas por ROS estão associadas a danos na memória e que o DS12 é capaz de reverter o dano

causado pela STZ neste parâmetro em hipocampo, córtex cerebral e cerebelo. Além de aumentar os níveis de ROS, nos animais que receberam STZ também foi observado alterações nas enzimas antioxidantes CAT e SOD. Esses achados corroboram com estudos anteriores que também demonstraram um aumento nos marcadores de dano oxidativo induzido pela administração de STZ, bem como uma redução nas defesas antioxidantes, como CAT, tanto no hipocampo como em córtex cerebral (Teixeira et al., 2020). O composto DS12 apresentou ação antioxidante, aumentando a atividade da enzima CAT em todas estruturas cerebrais avaliadas. Já em relação à enzima SOD, o grupo STZ não apresentou redução na atividade da enzima em nenhuma estrutura cerebral quando comparado ao controle, no entanto, os tratamentos com o composto DS12 e DON foram capazes de aumentar a atividade dessas enzimas comparados ao grupo STZ.

Os dados obtidos das análises bioquímicas e hematológicas sugeriram que o tratamento não causou danos bioquímicos e hematológicos sistêmicos e que o tempo de tratamento, bem como a dose utilizada, foram bem tolerados pelos animais, visto que não houveram quaisquer alterações nos parâmetros avaliados em nenhum grupo experimental.

Sendo assim, os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a administração de DS12 por via oral durante 20 dias foi capaz de reverter os déficits de memória causados pela STZ em ratos, apresentando resultados promissores tanto em tarefas comportamentais, quanto em parâmetros enzimáticos e oxidativos. Além disso, o tratamento com DS12 não causou alterações nos parâmetros bioquímicos, hematológicos, comportamentais, neurológicos e oxidativos no grupo tratado apenas com o composto quando comparado ao grupo controle sugerindo que o composto DS12 pode ser uma alternativa promissora no tratamento da DA.

5 Conclusão

O tratamento com DS12 preveniu as alterações na memória, atividade da AChE e parâmetros de estresse oxidativo induzidos por STZ de maneira semelhante ao fármaco donepezil. Além disso, nossos achados demonstram que o tratamento com DS12 por 20 dias não alterou parâmetros bioquímicos e hematológicos sugerindo que este composto foi bem tolerado pelos animais quando administrado por via oral na dose de 10 mg/kg, trazendo assim, novas perspectivas para estudos futuros. O composto DS12 pode ser promissor para modular alterações cerebrais associadas à DA, entretanto, mais estudos são necessários para avaliar outros mecanismos envolvidos no seu efeito neuroprotetor.

Referências Bibliográficas

- ABEYSINGHE, A. A. D. T.; DESHAPRIYA, R. D. U. S.; UDAWATTE, C. Alzheimer's disease; a review of the pathophysiological basis and therapeutic interventions. **Life Sciences**, v.256, p.117996, 2020.
- ALLOWAY, T.; GATHERCOLE, S. How does working memory work in the classroom? **Educational Research and Reviews**, v. 1, n 4, p. 134-139, 2006.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. **Alzheimer's disease facts and figures**, 2020.
- ANG, S.Y.; LEE, K. (2008). Involvement of the central executive in children's spatial memory. **Memory**, v. 16, n. 8, p. 918-933, 2008.
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES A. A. Acetilcolinesterase — AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n.6, p.1818-1834, 2016.
- BADDELEY, A. The episodic buffer: a new component of working memory? **Trends in Cognitive Science**, v. 4, n. 11, p. 417-423, 2000.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, n.4, p.629-43, 2010.
- BASSANI, T. B. et al. Decrease in adult neurogenesis and neuroinflammation are involved in spatial memory impairment in the streptozotocin-induced model of sporadic Alzheimer's disease in rats. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 5, p. 4280-4296, 2018.
- BIASIBETTI, R. et al. Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer's disease are dependent on sex. **Behavioural Brain Research**, v. 316, p. 205-214, 2017.
- BITENCOURT, E. M. et al. Doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos, qualidade de vida, estratégias terapêuticas da fisioterapia e biomedicina. **Inova Saúde**, v. 8, n. 2, p. 138-157, 2019.
- CARNELOZ, C. O. **Auxílio no diagnóstico da doença de Alzheimer a partir de imagens de ressonância magnética utilizando competição e cooperação entre partículas**, 2019.
- CAVALCANTI, J. L. S.; ENGELHARDT, E. Aspectos da Fisiopatologia da Doença de Alzheimer Esporádica. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 48, n. 4, p. 21-29, 2012
- CHEN, Y. et al. A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse). **Molecular Neurobiology**, v. 47, n. 2, p. 711-725, 2013.
- CORREIA, S.C. et al. Mitochondrial abnormalities in a streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, v. 10, n. 4, p. 406-19, 2013.

DA SILVA, D. S. et al. Multitarget Effect of 2-(4-(Methylthio) phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl) propyl) thiazolidin-4-one in a Scopolamine-Induced Amnesic Rat Model. **Neurochemical Research**, v. 46, n. 6, p. 1554-1566, 2021.

DA SILVA, D. S. et al. Thiazolidin-4-ones from 4-(methylthio) benzaldehyde and 4-(methylsulfonyl) benzaldehyde: synthesis, antiglioma activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 124, p. 574-582, 2016.

DA SILVA, D.S. et al. In vitro effects of 2-{4-[methylthio(methylsulfonyl)]phenyl}-3-substitutedthiazolidin-4-ones on the acetylcholinesterase activity in rat brain and lymphocytes: isoform selectivity, kinetic analysis, and molecular docking. **Neurochemical Research**, v. 45, n. 2, p. 241-253, 2020.

DE LA MONTE, S. M.; WANDS, J. R. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. **American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias**, v. 7, n. 1, p. 45-61, 2005.

DEEP, A. et al. Synthesis of 2-(aryl)-5-(arylidene)-4-thiazolidinone derivatives with potential analgesic and antiinflammatory activity. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 8, p. 1652–1659, 2012.

DENOS, M.; HASBOUN, D.; BAULAC, M. Memory for visuospatial location following selective hippocampal sclerosis: the use of different coordinate systems. **Neuropsychology**, v. 18, p. 15-28, 2004.

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

FDA. U.S. Food and Drug Administration. **Drug Safety and Availability**, 2021.

FERRARI, C. et al. Imaging and cognitive reserve studies predict dementia in presymptomatic Alzheimer's disease subjects. **Journal of Neurodegenerative Diseases**, v. 13, n. 2-3, p. 157–159, 2014.

GEMELLI, T. et al. Estresse oxidativo como fator importante na fisiopatologia da Doença de Alzheimer. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 16, n. 1, p. 67-78, 2013.

HAVRYLYUK, D.; ZIMENKOVSKY, B.; LESYK, R. Synthesis and anticancer activity of novel nonfused bicyclic thiazolidinone derivatives. **Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements**, v. 184, n. 3, p. 638-650, 2009.

HENRIKSEN K. et al. The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 10, n. 1, p. 115–131, 2014.

HUANG, L.K.; CHAO, S.P.; HU, C.J. Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, p. 1-13, 2020.

IRVINE, K. et al. Greater cognitive deterioration in women than men with Alzheimer's disease: a meta analysis. **Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology**, v. 34, n. 9, p. 989–998, 2012.

JAIN, A. K. et al. Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 3378- 3395, 2012.

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

KHERADMAND, E.; HAJIZADEH MOGHADDAM, A.; ZARE, M. Neuroprotective effect of hesperetin and nano-hesperetin on recognition memory impairment and the elevated oxygen stress in rat model of Alzheimer's disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 1096-1101, 2018.

KRAEUTER, A. K.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. **Pre-Clinical Models**, v. 1916, p. 105–111, 2018.

KUMAR, A. et al. Animal Models in Drug Discovery of Alzheimer's Disease: A Mini Review. **Ec Pharmacology and Toxicology**, v. 2, p. 60-79, 2016.

LADEMANN, J. et al. Uptake of antioxidants by natural nutrition and supplementation: pros and cons from the dermatological point of view. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 24, n. 5, p. 269-273, 2011.

LÓPEZ, A. L. et al. Antioxidants, a paradigm for diseases treatment. **Revista ANACEM**, v. 6, n. 1, p. 48-53, 2012.

MOTA, W. M. et al. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 624-628, 2012.

National Collaborating Centre for Mental Health (NCCMH). Dementia A NICE–SCIE Guideline on supporting people with dementia and their carers in health and social care. **London: The British Psychological Society and Gaskell**, 2007.

OMAR, K. et al. Novel 4-thiazolidinone derivatives as potential antifungal and antibacterial drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 426-432, 2010.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Demência**, 2020.

PEINADO M. et al. Envejecimiento y neurodegeneración: bases moleculares y celulares. **Revista de Neurología**, v. 31, n. 11, p. 1054-1065, 2000.

RAINA, P. et al. Effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for treating dementia: evidence review for a clinical practice guideline. **Annals of Internal Medicine**, v. 148, n. 5, p. 379–97, 2008.

RAJASEKAR, N. et al. Intranasal insulin administration ameliorates streptozotocin (ICV)-induced insulin receptor dysfunction, neuroinflammation, amyloidogenesis, and memory impairment in rats. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 8, p. 6507-6522, 2017.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; Drogas que Inibem a Cholinesterase. **Guanabara Koogan**, v.4, p.110-115, 2001.

RIEDEL G. et al. Scopolamine-induced deficits in social memory in mice: reversal by donepezil. **Behavioural Brain Research**, v. 204, n. 1, p. 217-25, 2009.

RODRÍGUEZ-MÉNDEZ, A. J. et al. Timbe (*Acaciella angustissima*) pods extracts reduce the levels of glucose, insulin and improved physiological parameters,

hypolipidemic effect, oxidative stress and renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2812, 2018.

SANTOS, K. R. S. et al. Aspectos característicos da neuropatia no portador da Doença de Alzheimer. **Revista Brasileira Interdisciplinar de Saúde**, v. 2, n. 1, p. 70-76, 2020.

SANTOS, T. O. et al. Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. **Physiology & Behavior**, v. 107, n. 3, p. 401-413, 2012.

SCHURGIN, M. W. Visual memory, the long and the short of it: A review of visual working memory and long-term memory. **Attention, Perception, & Psychophysics**, v. 80, p. 1035–1056, 2018.

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 30, n. 1, 2008.

SHARMA, M.; BRIYAL, S.; GUPTA, Y.K., Effect of alpha lipoic acid, melatonin and trans resveratrol on intracerebroventricular streptozotocin induced spatial memory deficit in rats. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 49, n. 4, p. 395-402, 2005.

SHIH, M.; KE, F. Syntheses and evaluation of antioxidant activity of sydnonyl substituted thiazolidinone and thiazoline derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 17, p. 4633-4643, 2004.

STEINBROOK, R. The accelerated approval of aducanumab for treatment of patients with Alzheimer disease. **JAMA Internal Medicine**, v. 181, n. 10, p. 1281-1281, 2021.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, v. 50, n. 6, p. 537-546, 2001.

TANOVIC, A. et al. Neuroprotección con memantina (antagonista no competitivo del receptor NMDA-glutamato) frente a la excitotoxicidad asociada al glutamato en la enfermedad de Alzheimer y en la demencia vascular. **Revista de Neurología**, v. 42, p. 607-16, 2006.

TANZI, R. E. FDA approval of aduhelm paves a new path for Alzheimer's disease. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 12, n. 15, p. 2714-2715, 2021.

TEIXEIRA, F.C. et al. Inosine protects against impairment of memory induced by experimental model of Alzheimer disease: a nucleoside with multitarget brain actions. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 237, n. 3, p. 811-823, 2020.

TREVISAN, Kaynara et al. Theories of aging and the prevalence of Alzheimer's disease. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

TRIPATHI, A.C. et al. 4-Thiazolidinones: The advances continue... **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 72, p. 52-77, 2014.

VANNUCCHI, H. et al. Papel de dois nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 31, n. 1, p. 31-44, 1998.

VAZ, M.; SILVESTRE, S. Alzheimer's disease: Recent treatment strategies. **European Journal of Pharmacology**, p. 173554, 2020.

VELLAS, B. et al. Impact of nutritional status on the evolution of Alzheimer's disease and on response to acetylcholinesterase inhibitor treatment. **Journal of Nutrition, Health & Aging**, v. 9, n. 2, p. 75-80, 2005.

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

VERCOZA, G. L. et al. Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de novas 4-tiazolidinonas obtidas a partir de formilpiridina tiossemicarbazonas. **Química Nova**. v. 32, n. 6, 2009.

VIEIRA, G. D. et al. Beta-amyloid peptide deposition and vascular changes present in Alzheimer's disease. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 2, n. 4, p. 218-223, 2014.

YANG, S. et al. Protective effects of p38 MAPK inhibitor SB202190 against hippocampal apoptosis and spatial learning and memory deficits in a rat model of vascular dementia. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 215798, 2013.

Anexos

Anexo: Carta de parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal

UNIVERSIDADE FEDERAL
DE PELOTAS

PARECER Nº 87/2020/CEEA/REITORIA
PROCESSO Nº 23110.014002/2020-96

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Efeito do composto 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(3-(piperidin-1-il)propil)thiazolidin-4-ona na memória e no sistema colinérgico de ratos submetidos a modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer**”, registrada com o nº 23110.014002/2020-96, sob a responsabilidade de **Roselia Maria Spanevello** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica(ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de **08 de julho de 2020**.

Finalidade	(x) Pesquisa	() Ensino
Vigência da autorização	01/08/2020 a 01/08/2023	
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar	
Nº de animais	120	
Idade	60 dias	
Sexo	Machos	
Origem	Biotério Central - UFPel	

Código para cadastro nº **CEEA 14002-2020**

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX**,



MédicoVeterinário, em 13/07/2020, às 15:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art.6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0997393** eo código CRC **F265020A**.

Referência: Processo nº 23110.014002/2020