

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“IMPACTOS DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO (II) EM
DIFERENTES ABORDAGENS DA AGREGAÇÃO DO
PEPTÍDEO BETA AMILOIDE”**

Marco Antonio Tiburcio*

Tese apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS, área de
concentração: QUÍMICA
INORGÂNICA.

Orientadora: Rose Maria Carlos

*Bolsista CNPq

São Carlos, São Paulo

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Marco Antonio Tiburcio, realizada em 28/03/2025.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Rose Maria Carlos (UFSCar)

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza (UFSCar)

Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti (UFSCar)

Prof. Dr. Andréa da Silva Torrão (USP)

Prof. Dr. Adriano Silva Sebollela (USP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Dedicatória

Aos meus pais, Nelson e Soraya, pela confiança e apoio nesses 12 anos de formação.

“Os químicos são uma estranha classe de mortais, impelidos por um impulso quase insano a procurar seus prazeres em meio a fumaça e vapor, fuligem e chamas, venenos e pobreza, e no entanto, entre todos esses males, tenho a impressão de viver tão agradavelmente que preferiria morrer a trocar de lugar com o rei da Pérsia.”

Johann Joachim B cher

“A educa o   a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.”

Nelson Mandela

“The first pride was a riot”

Sobre Stonewall, 1969

“God makes no mistakes, I was born this way”

Lady GaGa

Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos meus pais, Soraya e Nelson, por sempre acreditarem em mim. Por todo o apoio durante minha formação. À minha avó, Therezinha, por estar sempre conosco. Amo vocês!

Agradeço à UFSCar – São Carlos e ao Departamento de Química por ter sido minha segunda casa nesses 12 anos de jornada e aos professores que participaram da minha formação. *In memoriam* Prof. Milton Dufles Capelato.

Em especial, agradeço a Prof.^a Dr.^a Rose Maria Carlos pelos 7 anos de colaboração, pelos vastos ensinamentos e por ser uma incentivadora do nosso crescimento.

Aos amigos de LaFIB, que foram essenciais todos esses anos, Maria, Lorena e Bárbara pelos momentos compartilhados na saga do β -amiloide. Em especial à Lorena, pela parceria na síntese dos complexos.

Aos novos membros Anderson, Ana Carla e aos ICs Rafa, Rafinha, Pedro, Thais e Heitor, foi muito bom poder compartilhar momentos com vocês.

Ao Ygor, que tem sido meu maior parceiro e incentivador nesses quatro anos, te amo!

Agradeço a Prof.^a Dr.^a Mònica Garcia-Alloza da Universidad de Cádiz, por ter me recebido em seu laboratório durante o doutorado sanduíche. Ao Instituto de Investigación y Innovación Biomédica de Cádiz pela estrutura durante os ensaios *in vivo*.

Aos colegas que fiz durante minha estadia em Cádiz, Lourdes, Keko, Angel, Isa, Miriam, Inés e Maria. Obrigado por ajudarem no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Gabriel Henrique Ribeiro pelas atribuições e espectros de RMN.

Ao Carlos Rodrigues Costa e equipe do LNNano do CNPEM pela ajuda com as imagens de AFM; (CNPEM; proposta 20221197);

Ao Prof. Dr. Wallance Pazin pelo auxílio nas imagens de FLIM.

À Prof.^a Dr.^a Ana Paula Ullian e equipe pela estrutura nos ensaios de dicroísmo circular.

À Prof.^a Dr.^a Márcia Regina Cominetti e à Marina Grigoli pelos experimentos de viabilidade celular.

À Dr.^a Mariana Cali pelos experimentos de nefelometria, dicroísmo circular e TEM com o A β ₄₂.

À mim, por não ter desistido e feito um trabalho do qual me orgulho.

Aos colaboradores e técnicos administrativos que indiretamente colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

Às agências de fomento, CNPq pela bolsa de doutorado (Processo 140407/2021-9); CAPES pela bolsa de internacionalização (88887.836349/2023-00) e FAPESP.

Lista de Abreviaturas

- 3,4Apy** – 3,4-diaminopiridina
- 4G8** – Anticorpo Monoclonal 4G8
- A β** – Peptídeo β -amiloide
- AFM** – Microscopia de Força Atômica
- APOE** – Apolipoproteína E
- APP** – Proteína precursora do amiloide
- APP/PS1** – Modelo de camundongos transgênico
- ATPA1** – Transportador de ATP A1 (ABCA1)
- BHE** – Barreira hematoencefálica
- bpy** – 2,2'-bipiridina
- CD** – Dicroísmo Circular
- CSF** – Fluido cerebrospinal
- CT** – Tomografia computadorizada
- DA** – Doença de Alzheimer
- DM** – Diabetes Mellitus
- dppz** – dipirido[3,2-a:2',3'-c]-fenazina
- DT2** – Diabetes Tipo 2
- ELISA** – Ensaio de imunoabsorção enzimática
- ENFs** – Emaranhados neurofibrilares
- EO** – Estresse oxidativo
- EROs** – Espécies Reativas de Oxigênio
- FBS** – Soro fetal bovino
- FLIM** - Microscopia de Imagem por Tempo de Vida de Fluorescência
- GFAP** – Proteína ácida fibrilar glial
- hIAPP** – Polipeptídeo amiloide das ilhotas humanas

- HDL** – Lipoproteína de alta densidade
- IDE** – Enzima degradante de insulina
- IgG1** – Imunoglobulina G1
- ILCT** – Transferência de carga intra-ligante
- IMR** – Redução Imunomagnética
- IP** – Intraperitoneal
- IP-MS** – Imunoprecipitação acoplada à espectroscopia de massas
- LRP1** – proteína 1 relacionada ao receptor de lipoproteínas de baixa densidade
- MLCT** – Transferência de carga do metal para o ligante
- MMF** – Microscopia Multifotônica
- MRI** – Imagem por ressonância magnética
- NEP** – Neprilisina
- NfL** – Neurofilamentos leves
- NMDA** – N-metil-d-aspartato
- OMS** – Organização Mundial da Saúde
- pNDIp** - N,N'-bis-1,10-fenantrolina-1,4,5,8-naftalenotetracarboxílico diimida
- PBS** – Tampão fosfato salino
- PC12** – Células de feocromocitoma
- PET** – tomografia por emissão de pósitrons
- phen** – 1,10-fenantrolina
- PSEN1** – Presinilina 1
- PSEN2** – Presinilina 2
- p-tau** – proteína tau hiperfosforilada
- RAGE** – receptores para produtos finais de glicação avançada
- RPM** – Rotações por minuto
- RuApy** – *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺

RuNDI - *cis*-[Ru(phen)₂(pNDIp)]²⁺

SIMOA – Matriz de molécula única

SNC – Sistema Nervoso Central

TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão

ThS – Tioflavina-S

ThT – Tioflavina-T

Tg2576 – Modelo de camundongo transgênico

Tyr – Tirosina

URNs – Unidades Relativas de Nefelometria

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Atribuições dos espectros de RMN de ^1H obtidos para o complexo RuApy em DMSO- d_6 . Os respectivos hidrogênios estão apresentados em deslocamento químico (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (Hz) e a quantidade de hidrogênios..... 42
- Tabela 2.** Valores de tempo de vida de emissão obtidos por microscopia de fluorescência resolvida no tempo (FLIM) para as combinações A β /RuApy e A β /Ins/RuApy nos tempos 0h e 24h..... 55
- Tabela 3.** Atribuições dos espectros de RMN de ^1H obtidos para o ligante pNDIp em DMSO- d_6 . Os respectivos hidrogênios estão apresentados em deslocamento químico (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (Hz) e a quantidade de hidrogênios..... 81
- Tabela 4.** Atribuições dos espectros de RMN de ^1H obtidos para o complexo RuNDI em DMSO- d_6 . Os respectivos hidrogênios estão apresentados em deslocamento químico (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (Hz) e a quantidade de hidrogênios..... 85
- Tabela 5.** Valores de absorvidade molar ($\text{mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) para as transições eletrônicas do complexo RuNDI em PBS..... 88
- Tabela 6.** Levantamento bibliográficos realizado na plataforma PubMed para aplicação de compostos de Ru(II) em camundongos modelos da doença de Alzheimer. Os trabalhos foram analisados e sumarizados em: Ano; Composto/Dose; Modelo animal; Via de administração e principais resultados..... 105

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. Sequência de aminoácidos do peptídeo A β 42. | 5 |
| FIGURA 2. Proteólise da proteína precursora do amiloide (APP) pelas vias amiloidogênica e não-amiloidogênica. Criada usando BioRender.com | 6 |
| FIGURA 3. Principais mecanismos de ação da microglia frente à deposição amiloide. Criada usando BioRender.com..... | 10 |
| FIGURA 4. Curva sigmoide para a formação de estruturas característica da agregação de peptídeo A β . Criada usando BioRender.com..... | 11 |
| FIGURA 5. Esquema representativo da formação de ligações de hidrogênio em estruturas folha- β Paralela e Antiparalela em fibrilas amiloides. Criada usando BioRender.com | 12 |
| FIGURA 6. Comparação entre os microtúbulos de um neurônio saudável (verde) e um neurônio afetado por emaranhados neurofibrilares da proteína tau (marrom). Criada usando BioRender.com..... | 14 |
| FIGURA 7. Expressão e escoamento de biomarcadores da doença de Alzheimer do cérebro para a corrente sanguínea. Criada usando BioRender.com..... | 20 |
| FIGURA 8. Usos possíveis dos complexos de Rutênio em diversas vertentes para tratamento e diagnóstico da doença de Alzheimer. Criada usando BioRender.com | 25 |
| FIGURA 9. Esquema de rota sintética para obtenção do complexo RuApy..... | 35 |
| FIGURA 10. Atribuição dos hidrogênios presentes na estrutura do complexo RuApy | 41 |
| FIGURA 11. Espectro de RMN de ^1H para a região desblindada do complexo RuApy | 41 |
| FIGURA 12. Espectro de absorção eletrônica do complexo RuApy (30 μm) em PBS. | 43 |

- FIGURA 13.** Espectros de (A) emissão e (B) de deslocamento de Stokes entre a emissão (azul) e excitação (preto) obtidos para o complexo RuApy.44
- FIGURA 14.** Espectros de emissão obtidos para a cinética de agregação do peptídeo A β (20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) utilizando ThT (1:1) como marcador amiloide (A) e a progressão da resposta emissiva da ThT ao longo do tempo (B).45
- FIGURA 15.** Espectros de emissão da Tyr10 obtidos durante 24 horas para a agregação do peptídeo A β46
- FIGURA 16.** Espectros de dicroísmo circular obtidos para a agregação do peptídeo A β em 0h (preto), 3h (vermelho) e 24h (azul).48
- FIGURA 17.** Imagens de microscopia de força atômica obtidas durante a agregação do peptídeo A β em (A) e (B) 0 horas; (C) e (D) 3 horas; (E) e (F) 24 horas. As imagens (A); (C) e (E) possuem varredura de 2x2 μm e as imagens (B); (D) e (F) possuem varredura de 1x1 μm49
- FIGURA 18.** Espectros de emissão obtidos para a cinética de agregação cruzada entre (A) A β /Insulina e (B) A β /Insulina/RuApy.....50
- FIGURA 19.** Espectros de dicroísmo circular obtidos para a agregação cruzada entre (A) A β /Insulina e (B) A β /Insulina/RuApy nos tempos 0h (preto) e 24h (azul).....51
- FIGURA 20.** Imagens de microscopia de força atômica obtidas no tempo 0h para a agregação (A) e (B) do peptídeo A β ; (C) e (D) A β /Insulina; (E) e (F) A β /Insulina/RuApy. As imagens (A); (C) e (E) possuem varredura de 2x2 μm e as imagens (B); (D) e (F) possuem varredura de 1x1 μm52
- FIGURA 21.** Imagens de microscopia de força atômica obtidas no tempo 24h para a agregação (A) e (B) do peptídeo A β ; (C) e (D) A β /Insulina; (E) e (F) A β /Insulina/RuApy. As imagens (A); (C) e (E) possuem varredura de 2x2 μm e as imagens (B); (D) e (F) possuem varredura 1x1 μm53
- FIGURA 22.** Imagens de FLIM para os tempos 0h e 24h de agregação do (A,B) peptídeo A β /RuApy e (C,D) A β /Insulina/RuApy.....54

| | |
|---|----|
| FIGURA 23. Valores de viabilidade celular das células de neuroblastoma SH-SY5Y na presença do complexo RuApy ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$); do peptídeo A β e sua espécies fibrilares (fA β); E do peptídeo A β na presença de Insulina e Insulina/RuApy. *($p < 0,05$)56 | 56 |
| FIGURA 24. Esquema simplificado do mecanismo de absorção de um e dois fótons.63 | 63 |
| FIGURA 25. Esquema de rota sintética para a produção do ligante pNDIp.66 | 66 |
| FIGURA 26. Esquema de rota sintética para a produção do complexo RuNDI67 | 67 |
| FIGURA 27. Linha do tempo para os experimentos envolvendo camundongos transgênicos APP/PS1 dividida em: Crescimento e Desenvolvimento; Tratamento e Imageamento em tempo real e Sacrifício e Análises post-mortem.72 | 72 |
| FIGURA 28. Processo de implantação da janela craniana em camundongos transgênicos APP/PS1 para o seguimento de placas amiloides em tempo real.73 | 73 |
| FIGURA 29. Atribuição dos hidrogênios e carbonos presentes na estrutura do ligante pNDIp.....78 | 78 |
| FIGURA 30. Espectro de RMN de ^1H para a região desblindada do ligante pNDIp 79 | 79 |
| FIGURA 31. Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY da região desblindada do ligante pNDIp em DMSO- d_679 | 79 |
| FIGURA 32. Espectro de RMN ^1H - $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ HSCQ para a região desblindada do ligante pNDIp em DMSO- d_680 | 80 |
| FIGURA 33. Espectros de RMN ^1H - $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ HMBC da região desblindada do ligante pNDIp em DMSO- d_680 | 80 |
| FIGURA 34. Atribuição dos hidrogênios e carbonos presentes na estrutura do complexo RuNDI.....82 | 82 |
| FIGURA 35. Espectros de RMN de ^1H para a região desblindada do complexo RuNDI (roxo) e do ligante pNDIp (verde)83 | 83 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 36. Espectro de RMN 1H-1H COSY da região desblindada do complexo RuNDI em DMSO-d6..... | 83 |
| FIGURA 37. Espectro de RMN 1H – 13C{1H} HSCQ para a região desblindada do complexo RuNDI em DMSO-d6..... | 84 |
| FIGURA 38. Espectros de RMN 1H – 13C{1H} HMBC da região desblindada do complexo RuNDI em DMSO-d6..... | 84 |
| FIGURA 39. Espectros de absorção do complexo Ru(phen) ₃] ²⁺ (verde), do ligante pNDIp (vermelho) e do complexo RuNDI (preto) | 87 |
| FIGURA 40. Curva de calibração para o complexo RuNDI com concentrações entre 0 - 40 µmol.L ⁻¹ . inset: retas obtidas para o aumento da absorbância de acordo com o aumento da concentração molar em 265 nm (azul). 365 nm (vermelho), 385 nm (verde) e 450 nm (rosa) | 88 |
| FIGURA 41. Espectros de emissão do complexo RuNDI em diferentes concentrações (0 - 100 µmol.L ⁻¹) (A) e o comportamento da resposta emissiva com o aumento da concentração (B)..... | 89 |
| FIGURA 42. Deslocamento de Stokes entre a emissão (azul) e excitação (preto) obtidos para o complexo RuNDI em PBS. | 89 |
| FIGURA 43. Espectros de emissão obtidos após a adição do complexo RuNDI à fibrilas pré-formadas do peptídeo Aβ em (A) 340 nm e (B) 600 nm..... | 90 |
| FIGURA 44. Nefelometria do processo de agregação do peptídeo Aβ na ausência e na presença do complexo RuNDI em diferentes proporções..... | 91 |
| FIGURA 45. Espectros de dicroísmo circular obtidos ao final da agregação do peptídeo Aβ na ausência e presença do complexo RuNDI em diferentes proporções | 92 |
| FIGURA 46. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das estruturas formadas na agregação do peptídeo Aβ na ausência e na presença do complexo RuNDI (1:5)..... | 93 |

- FIGURA 47.** Imagens representativas de microscopia multifotônica de vasos sanguíneos marcados com Texas-Red (vermelho) e depósitos amiloides marcados com Methoxy-XO4 (azul). Imagens coletadas para um camundongo APP/PS1-Controle (azul) e para um camundongo APP/PS1-RuNDI (1 mg/kg/dia) (laranja).
.....95
- FIGURA 48.** (A) Tamanho de placas amiloides (μm^2) e (B) Carga de placas amiloides (%) para camundongos APP/PS1-Controle (Azul) e APP/PS1-RuNDI (Laranja). Nenhuma diferença estatística observada.96
- FIGURA 49.** Peso corporal dos camundongos WT com (laranja) e sem (azul escuro) tratamento e de camundongos APP/PS1 com (azul claro) e sem (verde) tratamento com o complexo RuNDI durante as 10 semanas de experimento.97
- FIGURA 50.** Peso cerebral dos camundongos WT e APP/PS1 com (laranja) e sem (azul) tratamento com o complexo RuNDI.98
- FIGURA 51.** Níveis de A β 40-42 solúveis ($\rho\text{mol/L}$) em amostras de plasma sanguíneo para camundongos APP/PS1-Controle (Azul) e APP/PS1-RuNDI (Laranja).99
- FIGURA 52.** Níveis de A β 40-42 (A) solúveis ($\rho\text{g/g}$) e (B) insolúveis ($\rho\text{g/g}$) em amostras de córtex para camundongos APP/PS1-Controle (Azul) e APP/PS1-RuNDI (Laranja).99
- FIGURA 53.** Imagens representativas de microscopia de fluorescência de seções do córtex de camundongos APP/PS1-Controle (azul) e APP/PS1-RuNDI (1mg/kg/dia), laranja. Depósitos amiloides foram marcados com ThS (λ_{ex} : 495nm; λ_{em} : 519nm), em verde e 4G8 (λ_{ex} : 540nm; λ_{em} : 575nm), em vermelho. 101
- FIGURA 54.** Parâmetros obtidos pela análise das imagens representativas do córtex de camundongos APP/PS1-Controle (Azul) e APP/PS1-RuNDI (Laranja) marcados com ThS e 4G8. (A) Tamanho de placas (μm^2); (B) Densidade de placas (número de placas/ mm^2) e (C) Carga de placas (% área). 102
- FIGURA 55.** Imagens representativas de microscopia de fluorescência de seções do hipocampo de camundongos APP/PS1-Controle (azul) e APP/PS1-RuNDI

(1mg/kg/dia), laranja. Depósitos amiloides foram marcados com ThS (λ_{ex} : 495nm; λ_{em} : 519nm), em verde e 4G8 (λ_{ex} : 540nm; λ_{em} : 575nm), em vermelho. 103

FIGURA 56. Parâmetros obtidos pela análise das imagens representativas do hipocampo de camundongos APP/PS1-Controle (Azul) e APP/PS1-RuNDI (Laranja) marcados com ThS e 4G8. (A) Tamanho de placas (μm^2); (B) Densidade de placas (número de placas/ mm^2) e (C) Carga de placas (% área). 104

RESUMO

IMPACTOS DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO (II) EM DIFERENTES ABORDAGENS DA AGREGAÇÃO DO PEPTÍDEO BETA AMILOIDE. A Doença de Alzheimer é a forma mais comum de demência, com custos projetados de 1 trilhão de dólares até 2030. Suas características principais incluem depósitos do peptídeo A β e emaranhados neurofibrilares da proteína tau hiperfosforilada. O aumento da expectativa de vida está relacionado ao aumento da incidência da doença, gerando um grande impacto social e financeiro. Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos do uso de complexos de Ru(II) como moduladores de agregação do A β em diferentes abordagens, da agregação heterogênea com insulina à aplicação em modelos *in vivo*. O efeito modulador do complexo RuApy na agregação cruzada entre o A β e insulina foi monitorado pela emissão da Tyr10, dicroísmo circular (CD) e AFM. Os espectros de emissão para o A β mostraram supressão da emissão da Tyr-OH (300 nm) para formação do íon Tyr-O⁻ (340 nm), comportamento não observado na presença de insulina e do complexo RuApy. As análises de CD e AFM mostraram a formação de agregados amorfos ao invés das fibrilas observadas para o A β . Os agregados formados na interação A β /Insulina e A β /Insulina/RuApy se mostraram menos tóxicos em relação aos agregados do A β , frente a células de neuroblastoma SH-SY5Y. Em outra vertente, as influências do complexo RuNDI na agregação do A β foram monitoradas por nefelometria, CD e TEM. A presença do complexo RuNDI apresentou redução significativa nas unidades relativas de nefelometria, além de suprimir sinais de folhas- β nos espectros de CD, indicando menor formação de agregados. As imagens de TEM revelaram a formação de agregados amorfos. As influências do complexo RuNDI na agregação do A β também foram

avaliadas em camundongos APP/PS1 modelos da DA. Esses animais desenvolvem a formação de depósitos de A β no córtex e hipocampo após 16 semanas de idade. O complexo foi ministrado via intraperitoneal com doses diárias de 1mg/kg/dia durante 10 semanas. A deposição amiloide foi acompanhada em tempo real por microscopia multifotônica e ao final dos experimentos foram realizados ensaios de ELISA e imunofluorescência em amostras de sangue e córtex. Embora não tenha sido possível avaliar a progressão da doença em tempo real, foram observados níveis mais baixos de A $\beta_{40/42}$ em amostras de córtex de camundongos tratados. A imunofluorescência usando ThS e 4G8 mostrou que o complexo RuNDI não afeta o tamanho das placas já existentes, mas reduz significativamente a densidade e carga de placas no córtex e hipocampo. Essas observações demonstram que os complexos RuApy e RuNDI impactam diretamente na fibrilação do A β em diferentes abordagens, levando a formação de fibrilas amorfas e atóxicas e reduzindo a formação de depósitos em áreas críticas do cérebro de camundongos transgênicos.

Palavras-chave: Complexos de Rutênio; Doença de Alzheimer; peptídeo beta-amiloide; agregação cruzada; animais transgênicos.

ABSTRACT

IMPACTS OF RUTHENIUM (II) COMPLEXES ON DIFFERENT APPROACHES TO AMYLOID BETA PEPTIDE AGGREGATION.

Alzheimer's Disease is the most common form of dementia, with projected costs of \$1 trillion by 2030. Its main features include deposits of the A β peptide and neurofibrillary tangles of the tau protein. Increased life expectancy is linked to the rising incidence of the disease, creating significant social and financial impacts. This study aims to evaluate the effects of Ru(II) complexes as modulators of A β aggregation in different approaches, from heterogeneous aggregation with insulin to *in vivo* applications. The modulating effect of the RuApy complex on cross-aggregation between A β and insulin was monitored through Tyr10 emission, circular dichroism (CD), and AFM. Emission spectra for A β showed suppression of Tyr-OH emission (300 nm) in favor of Tyr-O⁻ ion formation (340 nm), a behavior not observed in the presence of insulin and the RuApy complex. CD and AFM analyses revealed the formation of amorphous aggregates instead of the fibrils typically seen with A β . The aggregates formed in the A β /Insulin and A β /Insulin/RuApy interactions were less toxic compared to A β aggregates when tested on SH-SY5Y neuroblastoma cells. In another approach, the influence of the RuNDI complex on A β aggregation was monitored by nephelometry, CD, and TEM. The presence of the RuNDI complex significantly reduced relative nephelometry units and suppressed β -sheet signals in CD spectra, indicating reduced aggregate formation. TEM images revealed the formation of amorphous aggregates. The effects of the RuNDI complex on A β aggregation were also evaluated in APP/PS1 mice, a model for Alzheimer's Disease. These

animals develop A β deposits in the cortex and hippocampus after 16 weeks of age. The complex was administered intraperitoneally at daily doses of 1 mg/kg for 10 weeks. Amyloid deposition was monitored in real-time using multiphoton microscopy. ELISA and immunofluorescence assays were performed on blood and cortex samples at the end of the experiments. Although real-time disease progression could not be assessed, lower levels of A $\beta_{40/42}$ were observed in cortex samples from treated mice. Immunofluorescence using ThS and 4G8 showed that the RuNDI complex did not affect the size of existing plaques but significantly reduced plaque density and load in the cortex and hippocampus. These observations demonstrate that the RuApy and RuNDI complexes directly impact A β fibrillation in different approaches, leading to the formation of amorphous and non-toxic fibrils and reducing the formation of deposits in critical brain areas of transgenic mice.

Keywords: Ruthenium Complexes; Alzheimer's Disease; amyloid-beta peptide; cross-aggregation; transgenic mice.

Sumário

| | |
|---|-----------|
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. A doença de Alzheimer..... | 2 |
| 1.2. A hipótese da cascata amiloide..... | 3 |
| 1.3. O peptídeo β -amiloide | 4 |
| 1.3.1. A formação | 4 |
| 1.3.2. A eliminação | 7 |
| 1.3.3. A agregação..... | 10 |
| 1.4. A proteína tau..... | 13 |
| 1.5. Diagnósticos para a doença de Alzheimer | 15 |
| 1.6. Biomarcadores para a doença de Alzheimer | 16 |
| 1.7. Tratamentos para a doença de Alzheimer | 20 |
| 1.8. Complexos de Ru(II)..... | 22 |
| 1.9. Os ligantes 3,4Apy e pNDIp | 25 |
| 1.10. Hipótese..... | 27 |
| 2. O complexo cis-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ como agente modulador na agregação cruzada entre o peptídeo Aβ e insulina humana | 28 |
| 2.1. Contextualização..... | 29 |
| 2.1.1. Doenças Amiloides..... | 29 |
| 2.1.2. Diabetes e Insulina..... | 29 |
| 2.1.3. A doença de Alzheimer e a Diabetes Tipo II..... | 30 |
| 2.1.4. Agregação cruzada entre o peptídeo A β e insulina humana | 31 |
| 2.2. Objetivos do capítulo..... | 33 |
| 2.3. Materiais e métodos | 33 |
| 2.3.1. Reagentes..... | 33 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.3.2. | Síntese do complexo cis-[Ru(phen) ₂ Cl ₂]..... | 34 |
| 2.3.3. | Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (3,4Apy) ₂]..... | 34 |
| 2.3.4. | Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear..... | 35 |
| 2.3.5. | Espectroscopia de Absorção no UV-visível..... | 36 |
| 2.3.6. | Espectroscopia de Luminescência no Estado Estacionário 36 | |
| 2.3.7. | Preparo do Peptídeo Aβ ₄₂ | 36 |
| 2.3.8. | Preparo da Insulina Humana..... | 37 |
| 2.3.9. | Protocolo de Agregação..... | 37 |
| 2.3.10. | Ensaio de Fluorescência com Tioflavina-T..... | 37 |
| 2.3.11. | Ensaio de Fluorescência Intrínseca..... | 38 |
| 2.3.12. | Dicroísmo Circular..... | 38 |
| 2.3.13. | Microscopia de Força Atômica (AFM)..... | 38 |
| 2.3.14. | Microscopia de Imagem por Tempo de Vida de Fluorescência (FLIM)..... | 39 |
| 2.3.15. | Viabilidade Celular..... | 40 |
| 2.4. | Resultados e Discussão..... | 41 |
| 2.4.1. | Ressonância Magnética Nuclear..... | 41 |
| 2.4.2. | Absorção Eletrônica e Luminescência no Estado Estacionário..... | 43 |
| 2.4.3. | Agregação Homogênea do Peptídeo Aβ ₄₂ | 44 |
| 2.4.3.1. | Ensaio de Fluorescência com Tioflavina-T (ThT)..... | 44 |
| 2.4.3.2. | Ensaio de Luminescência Intrínseca..... | 45 |
| 2.4.3.3. | Dicroísmo Circular..... | 47 |
| 2.4.3.4. | Microscopia de Força Atômica..... | 48 |
| 2.4.4. | Agregação cruzada: peptídeo Aβ ₄₂ , Insulina humana e RuApy 49 | |
| 2.4.4.1. | Ensaio de Luminescência Intrínseca..... | 50 |
| 2.4.4.2. | Dicroísmo Circular..... | 51 |
| 2.4.4.3. | Microscopia de Força Atômica..... | 51 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4.5. Microscopia de Imagem por Tempo de vida de Fluorescência (FLIM) | 53 |
| 2.4.6. Viabilidade Celular..... | 55 |
| 2.5. Conclusões parciais..... | 58 |
| 3. As influências do complexo <i>cis</i>-[Ru(phen)₂(pNDIp)]²⁺ na agregação do peptídeo Aβ <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> | 60 |
| 3.1. Contextualização | 61 |
| 3.1.1. Modelos animais para a doença de Alzheimer..... | 61 |
| 3.1.2. Microscopia Multifotônica..... | 62 |
| 3.2. Objetivos do capítulo..... | 63 |
| 3.3. Materiais e Métodos | 64 |
| 3.3.1. Reagentes..... | 64 |
| 3.3.2. Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ Cl ₂]..... | 65 |
| 3.3.3. Síntese do ligante N,N'-bis-1,10-fenantrolina-1,4,5,8-naftalenotetracarboxílico diimida (pNDIp)..... | 65 |
| 3.3.4. Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (pNDIp)](PF ₆) ₂ (RuNDI)..... | 67 |
| 3.3.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear..... | 68 |
| 3.3.6. Espectroscopia de Absorção no UV-Visível..... | 68 |
| 3.3.7. Espectroscopia de Luminescência no estado estacionário | 69 |
| 3.3.8. Preparo do Peptídeo Aβ ₄₂ | 69 |
| 3.3.9. Nefelometria..... | 69 |
| 3.3.10. Dicroísmo Circular | 70 |
| 3.3.11. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) | 70 |
| 3.3.12. Animais e Tratamento | 71 |
| 3.3.13. Janela Craniana..... | 73 |
| 3.3.14. Microscopia Multifotônica..... | 74 |
| 3.3.15. ELISA para níveis de Aβ ₄₀ e Aβ ₄₂ solúveis e insolúveis | 75 |
| 3.3.16. Imunofluorescência de placas amiloides – 4G8 e ThS..... | 76 |
| 3.3.17. Estatística | 77 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3.4. | Resultados e Discussão | 78 |
| 3.4.1. | Ressonância Magnética Nuclear..... | 78 |
| 3.4.1.1. | pNDIp | 78 |
| 3.4.1.2. | RuNDI..... | 82 |
| 3.4.2. | Espectroscopia de Absorção e Luminescência..... | 87 |
| 3.4.3. | Marcador amiloide..... | 90 |
| 3.4.4. | Nefelometria..... | 91 |
| 3.4.5. | Dicroísmo Circular | 92 |
| 3.4.6. | Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) | 92 |
| 3.4.7. | Microscopia Multifotônica..... | 94 |
| 3.4.8. | Peso Corporal e Cerebral..... | 97 |
| 3.4.9. | ELISA..... | 98 |
| 3.4.10. | Imunofluorescência..... | 100 |
| 3.4.10.1. | Córtex..... | 100 |
| 3.4.10.2. | Hipocampo..... | 102 |
| 3.5. | Conclusões Finais | 107 |
| 4. | Referências..... | 110 |

1.

Introdução

"Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre"

- Paulo Freire

1.1. A doença de Alzheimer

As doenças neurodegenerativas são causadas pela destruição irreversível dos neurônios afetando diretamente diversas funções do sistema nervoso central (SNC), causando problemas motores e cognitivos.¹ Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde) a doença de Alzheimer (DA) está associada à 60-70% dos casos de demência no mundo e só nos EUA possui um gasto de 172 bilhões de dólares por ano com assistência médica.^{2,3}

O aumento da expectativa de vida reflete diretamente na incidência da DA, criando um cenário de alto custo social e financeiro tanto para os pacientes quanto para os sistemas públicos de saúde. Esse impacto se estende a diversos setores da sociedade, sendo ainda mais crítico em países de baixa renda, onde a população está mais vulnerável a fatores de risco e enfrenta maiores barreiras no acesso a tecnologias, diagnóstico precoce e estratégias de prevenção.⁴⁻⁶ A DA é considerada um “transtorno neurocognitivo maior”, de diagnóstico clínico, caracterizada pelo desenvolvimento de déficits cognitivos que comprometem a funcionalidade do indivíduo. Diante disso, torna-se necessário o desenvolvimento de estratégias para seu diagnóstico precoce.⁷

Reportada pela primeira vez há 120 anos pelo médico psiquiatra alemão Alois Alzheimer, os sintomas da DA incluíam perda da memória recente, paranoia, problemas motores e de linguagem. Análises *post-mortem* realizadas por ele mostraram a presença de depósitos fibrilares intra e extracelulares, além de atrofia cerebral.⁸

As causas reais da DA não são completamente esclarecidas, entretanto, existem diversos fatores de risco associados ao desenvolvimento dessa neuropatologia. Os fatores não-modificáveis para a DA incluem predisposição genética, idade avançada e a presença do alelo ApoE ϵ 4.⁹ Já os fatores de risco modificáveis incluem a presença de outras doenças, como hipertensão, diabetes e depressão, mas também estão relacionados a aspectos do estilo de vida e do ambiente em que o indivíduo está inserido. De acordo com Livingston et al. (2020), foram identificados 14 fatores de risco modificáveis ao longo da vida que, juntos, poderiam prevenir ou retardar até 40% dos casos de demência. Entre eles, destacam-se: baixa escolaridade, inatividade física, obesidade, tabagismo, consumo excessivo de álcool, perda auditiva não tratada, traumatismo craniano, exposição prolongada à poluição do ar, isolamento social, além de hipertensão, diabetes, depressão, exposição ocupacional a pesticidas e condições adversas de desenvolvimento associadas à desigualdade social. A identificação e o manejo desses fatores ao longo da vida são fundamentais para estratégias de prevenção e para a redução da carga global da doença de Alzheimer e outras demências.¹⁰⁻¹²

1.2. A hipótese de cascata amiloide

A DA tem sido amplamente estudada sob diversas perspectivas, resultando em múltiplas hipóteses sobre sua origem e progressão. A mais aceita atualmente é a hipótese da cascata amiloide, que propõe que a produção e deposição excessiva do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) no meio extracelular é o evento inicial da patogênese. Considerada a principal causa da DA, a agregação do $A\beta$ desencadeia uma série de desequilíbrios

bioquímicos que culminam em neurodegeneração.¹³ Esse acúmulo induz, ainda, a formação dos emaranhados neurofibrilares (ENFs) da proteína tau, outro marcador patológico fortemente associado à morte neuronal. Com base nessa hipótese, buscam-se terapias que inibam a formação dos depósitos amiloides ou que favoreçam sua eliminação no cérebro de pacientes com DA.¹⁴

A partir da hipótese da cascata amiloide, surgiram outras abordagens complementares que visam aprofundar o entendimento da DA. Entre elas, destaca-se a hipótese dos oligômeros de $A\beta$, que considera essas formas solúveis como mais neurotóxicas do que as placas amiloides maduras. Já a hipótese da proteína tau passou a ganhar destaque ao evidenciar que a hiperfosforilação dessa proteína e a formação dos ENFs estão diretamente relacionadas à disfunção sináptica e à progressão da doença.^{13,14} Embora mais recentes, essas hipóteses não são excludentes, mas sim extensões ou refinamentos da hipótese amiloide, reforçando a complexidade dos mecanismos envolvidos na neurodegeneração observada na DA.

1.3. O peptídeo β -amiloide

1.3.1. A formação

O peptídeo $A\beta$ é produto da clivagem da proteína precursora do amiloide (APP), uma proteína transmembrana expressa em diversas células do SNC, principalmente nos neurônios, envolvida na manutenção da neuroplasticidade e da homeostase sináptica.¹⁵ Podendo variar entre 37-43 aminoácidos, as isoformas mais comuns do peptídeo $A\beta$ são os fragmentos $A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$. A isoforma $A\beta_{40}$ é a mais abundante no cérebro

e a isoforma A β ₄₂ (Figura 1) é considerada a mais tóxica e propensa a agregação, sendo a principal componente dos depósitos fibrilares do peptídeo A β encontrados no cérebro de pessoas com DA.^{16,17}

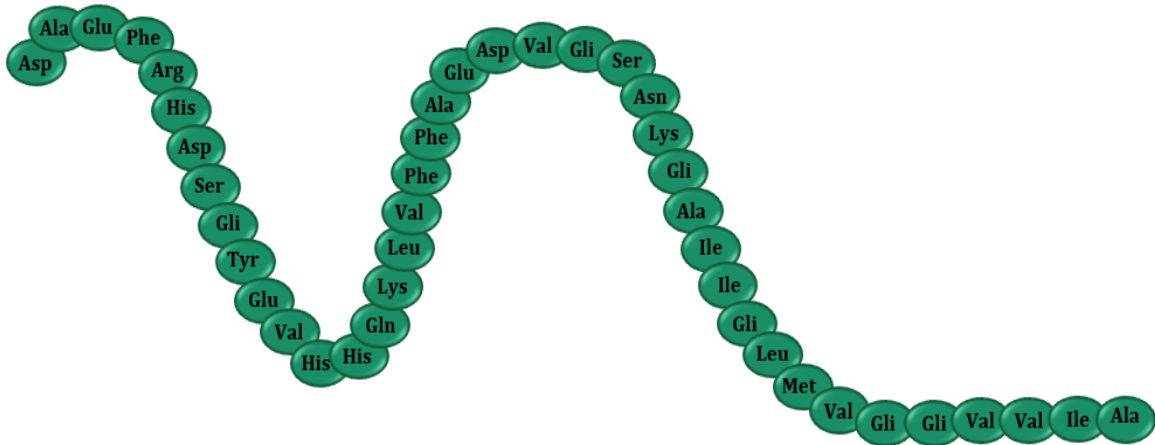


FIGURA 1. Sequência de aminoácidos do peptídeo A β ₄₂.

A APP pode ser clivada por duas vias diferentes (Figura 2). A via amiloidogênica leva a clivagem da APP pelas enzimas β -secretase e γ -secretase, resultando na formação do peptídeo A β .^{18,19} A β -secretase define a região N-terminal da proteína, liberando o fragmento sAPP β (hidrossolúvel), enquanto a γ -secretase cliva a região C-terminal, liberando o peptídeo A β no espaço extracelular. Na via não amiloidogênica, a APP é clivada pela α -secretase, gerando sAPP α que é solúvel, impedindo a formação de β -amiloide. O fragmento gerado é processado pela γ -secretase, liberando o peptídeo p3, que não está associado a toxicidade.^{18,19}

A clivagem da APP pode ser influenciada por diversos fatores, e qualquer alteração que afete o balanço entre as duas vias de processamento resultará na produção excessiva do peptídeo A β . Por exemplo, a atividade da β -secretase é otimizada em pH baixo, sendo

estimulada em condições de acidose, estresse oxidativo ou hipóxia.^{20,21} Já a ação da γ -secretase e da β -secretase é induzida por altos níveis de colesterol no sangue.²² Além disso, o mau funcionamento da α -secretase, causado pela deficiência de Zn(II) nos sítios ativos, favorece a via que leva à produção de A β .²³

Mutações genéticas também podem alterar o mecanismo de clivagem da APP, promovendo a formação de A β . O gene APP, localizado no cromossomo 21, pode sofrer mutações e aumentar a propensão para a produção de A β .²⁴ Indivíduos com síndrome de Down, que possuem uma cópia extra do cromossomo 21, apresentam um risco superior a 90% de desenvolver DA após os 70 anos.²⁵ Além disso, mutações nos genes da presenilina 1 e 2 (PSEN1 e PSEN2), que regulam a atividade do grupo das γ -secretase, também contribuem para a via amiloidogênica.²⁶

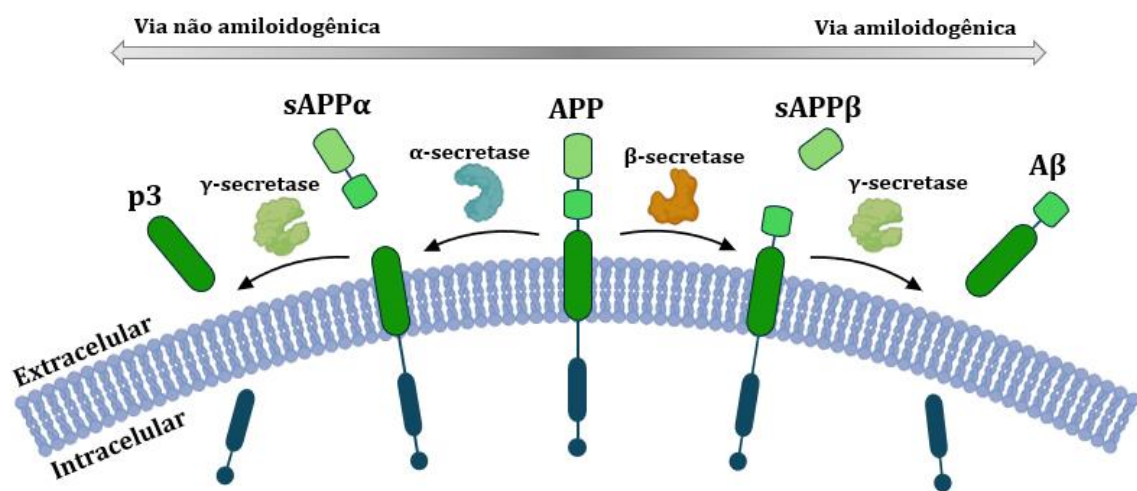


FIGURA 2. Proteólise da proteína precursora do amiloide (APP) pelas vias amiloidogênica e não-amiloidogênica. Criada usando BioRender.com

1.3.2. A eliminação

Não só um desequilíbrio nas vias de processamento da APP leva ao acúmulo do peptídeo A β . Na verdade, a produção de A β no cérebro em níveis saudáveis é normal, e existem mecanismos que atuam na remoção e processamento das espécies formadas durante o seu processo de agregação, a fim de evitar o acúmulo de amiloides. Em um cérebro saudável, a produção e eliminação de A β estão em equilíbrio, com uma taxa de processamento de aproximadamente 8% por hora.²⁷

Portanto, corrigir alterações dos níveis de A β é essencial para garantia da saúde cerebral. Existem dois mecanismos principais quando se trata da depuração das espécies amiloidogênicas do A β , o escoamento de A β solúvel para a circulação periférica e a degradação das formas solúveis e fibrilares pela ação de enzimas.²⁸ Para isso, existe uma rede funcional responsável pela eliminação de resíduos metabólicos do cérebro, conhecida como sistema glinfático. O funcionamento do sistema glinfático ocorre por meio do fluxo de fluido cerebroespinal ao longo dos vasos sanguíneos, processo mediado por astrócitos. As substâncias são então direcionadas ao sistema linfático meníngeo e eliminadas pela circulação periférica.^{29,30} Disfunções nesses mecanismos favorecem o acúmulo de A β , contribuindo para a progressão da DA.

O efluxo de A β solúvel pode ocorrer através da barreira hematoencefálica (BHE) para o sangue periférico, processo mediado pela proteína 1 relacionada ao receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LRP1) e a remoção em massa do fluido cerebroespinal (CSF)/fluido intersticial (ISF) para o sistema linfático.^{28,31} Esses

mecanismos podem ser alterados caso o peptídeo A β esteja ligado a proteínas chaperonas como é o caso da ApoE, envolvida na redistribuição de colesterol e fosfolipídeos no cérebro.³² A ApoE é a Apolipoproteína envolvida no transporte de lipídeos, presente em lipoproteínas como VLDL, IDL e HDL, desempenhando papel fundamental no metabolismo do colesterol e na homeostase lipídica, principalmente no SNC. É produzida nos astrócitos e se une à lipídeos através do transportador de ATP A1 (ABCA1) para formar HDL e facilitar o transporte de lipídeos insolúveis.^{32,33}

A ApoE possui três isoformas codificadas pelos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$, com variações nos aminoácidos das posições 112 e 158, modificando propriedades como efluxo de colesterol, formação de HDL e afinidade de ligação aos receptores.³⁴ O alelo $\epsilon 3$ é o mais comum em seres humanos e o alelo $\epsilon 2$ está associado a níveis elevados de HDL e menor risco de doenças cardiovasculares. O alelo $\epsilon 4$, por sua vez, é considerado o fator de risco mais importante no desenvolvimento da DA tardia, pois afeta negativamente o metabolismo de colesterol e de consumo de glicose no cérebro.^{35,36} Além disso, as ApoE podem atuar como chaperonas, ligando-se à proteínas mal dobradas ou agregadas, prevenindo a formação de depósitos amiloides. O alelo $\epsilon 4$ é menos eficiente que as outras isoformas na remoção de A β do cérebro.³⁷

Quando falamos do processamento do A β , a microglia é o conjunto de células especialistas na remoção de espécies tóxicas do cérebro. São fagócitos do sistema imunológico inato do SNC, essenciais para a captação e eliminação de espécies amiloidogênicas do peptídeo A β , desde monômeros e oligômeros até fibrilas.³⁸ A deposição amiloide ativa a microglia, desencadeando uma série de eventos que visam minimizar os impactos do acúmulo de A β . Uma das principais estratégias da

microglia para interferir na progressão da agregação amiloide é a formação de uma barreira física ao redor dos depósitos de A β .³⁹ Essa barreira impede a nucleação secundária e a formação de novos oligômeros a partir de fibrilas existentes. Em outras palavras, as células da glia envolvem e compactam os depósitos fibrilares, bloqueando a geração de novas espécies tóxicas.

Outra alternativa adotada pela microglia é expressão de proteases que ajudam na quebra de oligômeros e fibrilas, como é o caso da enzima degradante de insulina (IDE), da neprilisina (NEP) e das metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e 9).⁴⁰ Neste contexto, a NEP é a principal protease responsável pela degradação do A β , facilitando sua captação e eliminação. Essas proteases são enzimas dependentes de zinco ligados aos seus sítios ativos, ao passo que íons Zn(II) livres estabilizam o A β , impedindo sua degradação, ainda favorecerem a via amiloidogênica.^{41,42}

Para melhorar a captação de A β extracelular e seus fragmentos, a microglia expressa diversos receptores de superfície, receptores para produtos finais de glicação avançada (RAGE) e scavenger são exemplos.⁴³ As respostas celulares da microglia estão ilustrados na Figura 3.

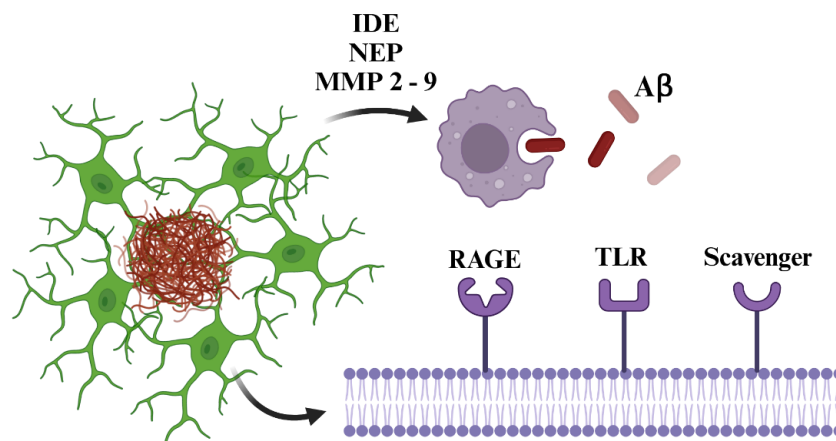


FIGURA 3. Principais mecanismos de ação da microglia frente à deposição amiloide. Criada usando BioRender.com

É notável os esforços da microglia para controlar os níveis de A β no cérebro, para isso essas células geram uma resposta inflamatória no ambiente, de modo a induzir “um estado de alerta” e estimular os mecanismos celulares descritos acima. Entretanto, a superexposição aos agentes pró-inflamatórios gerados pela microglia acabam afetando a eliminação de A β por fagocitose e ainda aceleram a deposição amiloide.⁴⁴

1.3.3. A agregação

As alterações na produção e eliminação dos fragmentos do peptídeo A β levam ao seu acúmulo no meio extracelular, iniciando um processo de autoagregação. As espécies monoméricas de A β , que são solúveis, se agregam formando oligômeros de diversos tamanhos. Esses oligômeros se organizam em protofibrilas, que, por sua vez, se associam para formar fibrilas maduras.⁴⁵

Depois de formados os primeiros agregados, o mecanismo de nucleação secundária domina a reação. Isto é, os agregados pré-formados atuam como núcleos de agregação, formando novas espécies oligoméricas na superfície.^{46,47} Esse fato reflete no comportamento da curva de agregação sigmoideal do A β , caracterizada por uma longa fase de nucleação, seguida de um aumento exponencial durante a fase de alongamento, que dura até que se estabeleça um equilíbrio entre agregados e monômeros,⁴⁸ como ilustrado na Figura 4.

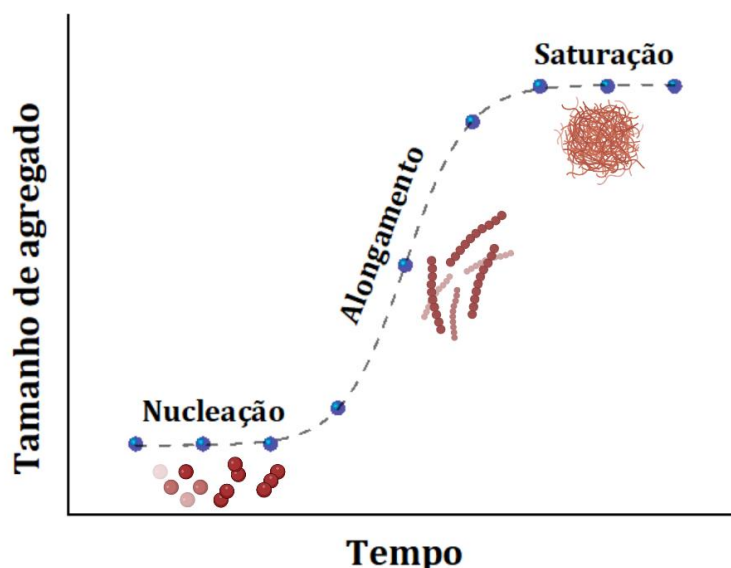


FIGURA 4. Curva sigmoide para a formação de estruturas característica da agregação de peptídeo A β . Criada usando BioRender.com

As fibrilas são estruturas altamente organizadas e termodinamicamente estáveis. Seu empilhamento é mediado principalmente por ligações de hidrogênio, que estabilizam a conformação de folhas- β ao longo do eixo de crescimento, como mostra a Figura 5. Durante o processo de fibrilação, o contato entre o meio fisiológico (aquoso) e a porção hidrofóbica do peptídeo A β aumenta,

especificamente entre os aminoácidos 17-21 (Leucina-Valina-Fenilalanina-Fenilalanina-Alanina), tornando-as insolúveis.⁴⁹

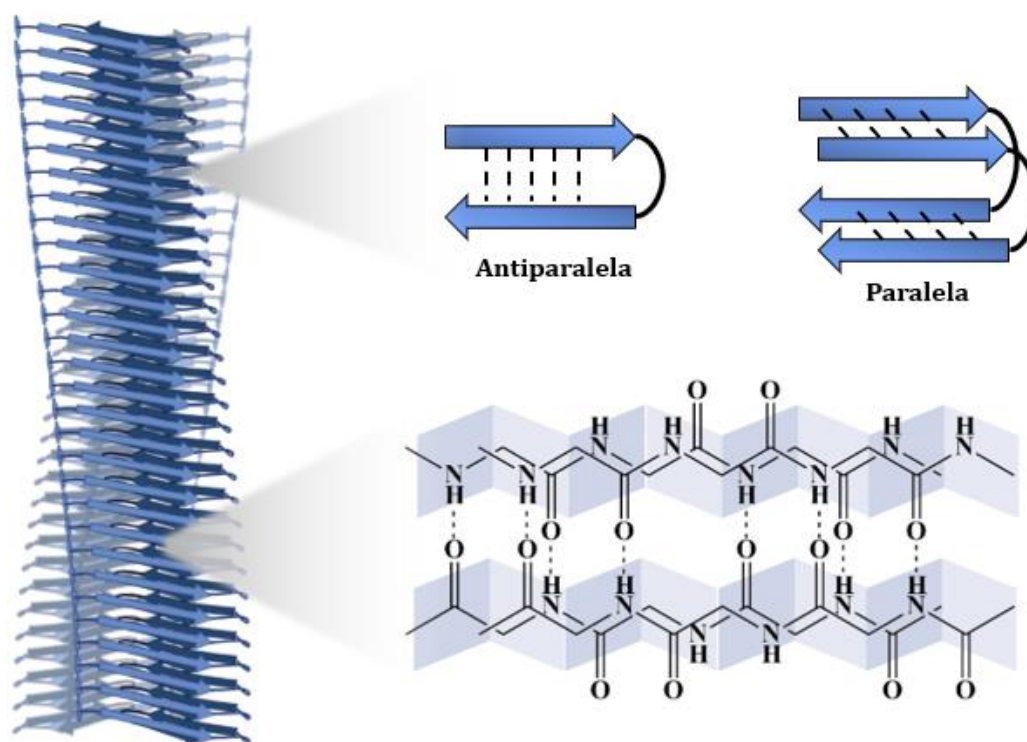


FIGURA 5. Esquema representativo da formação de ligações de hidrogênio em estruturas folha- β Paralela e Antiparalela em fibrilas amiloides. Criada usando BioRender.com

Embora as fibrilas sejam consideradas a fase final da agregação do $A\beta$ e, portanto, associadas ao desenvolvimento da DA, estudos sugerem que a formação dessas estruturas não está diretamente relacionada aos danos neurológicos observados em pacientes. Na verdade, evidências apontam que os oligômeros solúveis de $A\beta$ são os principais responsáveis pela perda sináptica e neuronal.⁵⁰

Estudos com indivíduos cognitivamente saudáveis mostraram que a carga de placas amiloides não está diretamente relacionada ao comprometimento cognitivo, uma vez que esses indivíduos apresentavam uma carga significativa de placas no cérebro, mas não

demonstravam perda de memória ou atrofia cerebral.^{51,52} Além disso, observou-se que oligômeros solúveis de A β induziram déficits cognitivos em modelos animais, mesmo na ausência de placas amiloides.⁵⁰ Por outro lado, agregados maiores, como as placas, não comprometeram a memória de camundongos Tg2576, que desenvolvem patologia de placas e déficits comportamentais.^{50,53}

A partir dessas observações levantou-se a “hipótese do oligômero”, que versa sobre os danos citotóxicos das espécies iniciais da agregação do A β .⁵⁴ Segundo ela, os oligômeros possuem atuação semelhante a de neurotoxinas, abrindo poros na membrana celular. Isso afeta diretamente a cadeia de transporte de elétrons, desregulando a homeostase de íons Ca²⁺ e levando a formação de radicais livres, responsáveis pelo aumento do estresse oxidativo nas células.^{54,55} Ainda se sugere que os oligômeros menores são responsáveis por ativar as vias pró-inflamatórias da microglia.⁵⁶

Os primeiros efeitos do processo de agregação do peptídeo A β podem preceder os principais sintomas clínicos em até 20 anos.⁵⁷ Dado a preocupação em torno da formação das espécies iniciais, é essencial o desenvolvimento de novas técnicas de detecção e diagnóstico precoce, além de técnicas que possam intervir na fibrilação do A β .

1.4. A proteína tau

Para além do acúmulo e deposição do peptídeo A β , são observados em pessoas com DA a presença de emaranhados neurofibrilares (ENFs) intracelulares. Os ENFs são constituídos da forma hiperfosforilada da proteína tau (p-tau) e é resultado do efeito “cascata” sugerido pela

hipótese amiloide.⁵⁸ A proteína tau é expressa em todo o SNC, principalmente nos axônios dos neurônios, desempenhando papel crucial na estabilização dos microtúbulos, na manutenção da forma e do transporte celular. Essa proteína se encontra associada aos microtúbulos por uma sequência de aminoácidos que permitem sua interação com a tubulina, proteína formadora dos microtúbulos.⁵⁹

A fosforilação e desfosforilação da proteína tau envolve a adição de grupos fosfato à sua estrutura, processo realizado por quinases como GSK-3 β , CDK5 e Akt. Esse mecanismo é crucial para controlar a interação da tau com os microtúbulos e garantir o funcionamento neuronal.⁶⁰ Um desequilíbrio nesse processo provoca a hiperfosforilação da proteína tau, levando à formação de aglomerados e prejudicando sua ligação com a tubulina, resultando em disfunções das células nervosas e favorecendo o avanço de doenças neurodegenerativas, como é o caso da DA.^{60,61} A Figura 6 compara a integridade dos microtúbulos em neurônios saudáveis e afetados pelos emaranhados neurofibrilares da proteína tau.

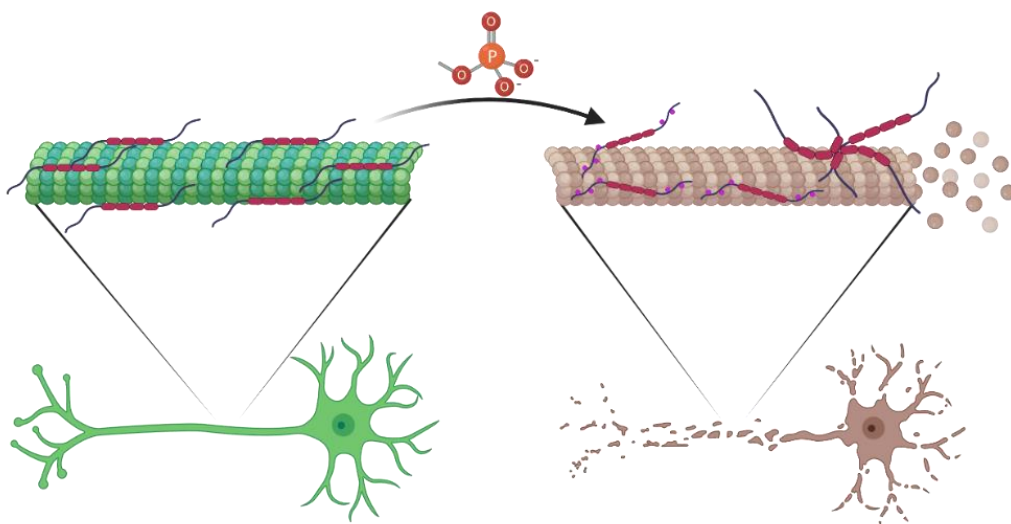


FIGURA 6. Comparação entre os microtúbulos de um neurônio saudável (verde) e um neurônio afetado por emaranhados neurofibrilares da proteína tau (marrom). Criada usando BioRender.com

Estudos têm mostrado uma relação significativa entre a toxicidade dos depósitos fibrilares do peptídeo A β e a formação de emaranhados intracelulares de proteína tau. Por exemplo, camundongos transgênicos, modelo de taupatia não-Alzheimer (P301L), apresentaram uma produção cinco vezes maior de ENFs quando receberam injeções de A β sintético diretamente no cérebro.⁶² Um estudo mais recente revelou que camundongos híbridos PS19:PDAPP, que possuem as mutações humanas tauP301S e APPV717F, apresentaram uma deposição acelerada de ENFs em comparação com os camundongos que expressam apenas uma das mutações. No entanto, a formação de placas amiloides não foi alterada.⁶³ Juntos, esses estudos sugerem que a patologia tau não é apenas um epifenômeno da deposição amiloide, mas sim necessária para a toxicidade do A β *in vivo*.^{62,63}

1.5. Diagnósticos para a doença de Alzheimer

Diagnosticar a DA em seus estágios iniciais é um dos grandes obstáculos enfrentados pela comunidade. Em geral, o diagnóstico clínico ocorre quando o paciente se encontra em estágio avançado da doença e apresenta sintomas de demência.

Técnicas atuais disponíveis para o diagnóstico da DA baseiam-se em imageamento por tomografia por emissão de pósitrons (PET) combinada com a tomografia computadorizada (CT) utilizando radiomarcadores de ¹⁸F e ¹¹C. Limitados ao uso em pacientes adultos com algum tipo de comprometimento cognitivo, os radioisótopos Amyvid™ (¹⁸F-florbetapir), Vizamyl™ (¹⁸F-flutemetamol), Neuraceq™ (¹⁸F-florbetaben), Tauvid™ (¹⁸F-flortaucipir) e ¹¹C-Pittsburgh Compound

B (^{11}C -PIB) detectam preferencialmente fibrilas e placas amiloides.^{64,65} O Tauvid™ (^{18}F -flortaucipir) também se mostrou eficiente na detecção dos ENFs da proteína tau.⁶⁶ Entretanto, nenhum deles detecta oligômeros solúveis.⁶⁵

As técnicas de CT e ressonância magnética (MRI) são técnicas de imageamento que podem avaliar o volume cerebral, danos à matéria branca do cérebro e alterações vasculares.⁶⁷ Contudo, técnicas de imageamento como PET, CT e MRI representam alto custo para o paciente, necessitam de equipamentos especializados e ainda assim não possuem um alto caráter preditivo.

Esse cenário reforça a necessidade de técnicas de detecção precoce que sejam de fácil acesso, baixo custo e sem efeitos secundários indesejados. Para isso, há um esforço da comunidade em estabelecer um painel de biomarcadores sanguíneos para a DA, que podem contribuir com um diagnóstico nos primeiros estágios da doença.

1.6. Biomarcadores para a doença de Alzheimer

A utilização de um painel de biomarcadores sanguíneos para a doença é fundamental devido à complexidade e heterogeneidade dos mecanismos patológicos envolvidos na DA. A interação de processos como a deposição de $\text{A}\beta$, hiperfosforilação da tau, neuroinflamação e disfunção sináptica requer uma abordagem integrativa para capturar com maior precisão as diferentes dimensões da doença.

Para isso, a utilização de amostras de sangue tem se revelado uma proposta promissora, de fácil acesso e baixo custo para o diagnóstico da DA. Desde o desenvolvimento de técnicas ultrasensíveis, pequenas

concentrações de biomarcadores específicos para a DA podem ser detectadas em amostras de sangue.⁶⁸ Estudos recentes demonstraram que o cérebro e os linfócitos do sangue de pacientes com DA possuem diversas semelhanças, como a expressão anormal da APP, aumento do estresse oxidativo, alteração nos níveis de enzimas antioxidantes e altas taxas de apoptose.⁶⁹

Derivadas da técnica de imunoabsorção enzimática (ELISA), técnicas como SIMOA (single-molecule array), redução imunomagnética (IMR) e imunoprecipitação acoplada à espectroscopia de massas (IP-MS) se mostraram sensíveis o suficiente para dar início ao mapeamento de biomarcadores pelo sangue.⁷⁰

Dentre os biomarcadores mais estudados em amostras de sangue, destacam-se o peptídeo A β , as isoformas da proteína tau hiperfosforilada, os neurofilamentos leves (NfL) e a proteína ácida fibrilar glial (GFAP).⁷¹

A β : Métodos de detecção ultrasensíveis no plasma sanguíneo permitiram a detecção de baixíssimas concentrações de A β _{40/42} em pessoas com DA quando comparados a indivíduos com declínio cognitivo subjetivo. A razão A β _{40/42} é um bom biomarcador para o diagnóstico clínico de demência, pois não sofre influências de fatores clínicos ou pré-clínicos.⁷² Porém, a produção periférica e a depuração hepática de A β limitam a precisão em amostras de sangue, afinal foram aferidas reduções de 10-20% dos níveis plasmáticos de A β em pessoas com DA, enquanto a redução no fluido cerebrospinal apresenta reduções de 40-60%.⁷³

Proteína tau: Os ENFs são uma marca da DA juntamente com os agregados do peptídeo A β . A proteína tau pode ser liberada no fluido

intersticial e fundir-se com o fluido cerebrospinal, sendo transportado para o plasma sanguíneo.⁷¹ Ainda que os níveis totais de tau não tenham valor diagnóstico para declínio cognitivo, outras isoformas da tau hiperfosforilada (p-tau) presentes no plasma tem se mostrado bons biomarcadores para diferenciar pessoas com DA de pessoas sem declínio cognitivo.⁷⁴

A p-tau181 é a isoforma mais estudada da proteína tau hiperfosforilada, com evidências mostrando que níveis elevados no plasma estão associados ao declínio cognitivo futuro em indivíduos cognitivamente intactos. A p-tau181 plasmática tem mostrado maior precisão do que a p-tau181 do líquido na previsão da progressão da DA.⁷⁵ Estudos recentes indicam que a reatividade dos astrócitos desempenha um papel crucial ao conectar o aumento de p-tau181 com A β em indivíduos, e as análises de Tau-PET mostraram um padrão de acumulação de tau relacionado à DA.⁷⁶

A p-tau217 plasmática é um biomarcador promissor para detectar o declínio cognitivo, com estudos mostrando que aumentos em seus níveis estão associados à piora da cognição, atrofia cerebral e maior risco de conversão para doença de Alzheimer. Assim como taxas aceleradas de declínio cognitivo e alterações cerebrais.⁷⁷ A p-tau217 não mostrou níveis elevados em pacientes com tauopatias não-DA, sugerindo sua especificidade para DA, embora mais estudos sejam necessários para confirmar isso.⁷⁷ Influenciada pela agregação do A β , a p-tau217 tem seus níveis elevados no plasma sanguíneo antes mesmo da disseminação de ENFs. Este biomarcador também mostrou o melhor desempenho em testes de variabilidade entre biomarcadores plasmáticos, e foi o melhor preditor de declínio cognitivo em duas coortes pré-clínicas de DA. A combinação de p-tau217 com outros

biomarcadores, como A β , NfL e GFAP, mostrou maior precisão para diagnosticar DA em estudos.⁷⁸

NfL: Os neurofilamentos leves são proteínas estruturais responsáveis, principalmente, pela manutenção da forma e integridade dos axônios nos neurônios. A presença dessas espécies no sangue ou no líquido está associada à danos neuronais, característica de diversas doenças neurodegenerativas.⁷⁹ Os NfLs são liberados quando os neurônios sofrem lesão ou degeneração, podendo ser utilizado como biomarcador para neurodegeneração na DA, mas também em outras neuropatologias como Parkinson e Esclerose Múltipla.⁸⁰

GFAP: A proteína ácida fibrilar glial (GFAP), encontrada nos astrócitos, tem função estrutural e sua produção aumenta em resposta à lesões, inflamações ou danos cerebrais, auxiliando no reparo das células da glia.⁸¹ No entanto, a ativação excessiva dos astrócitos pode agravar processos degenerativos ao aumentar a neuroinflamação. Níveis plasmáticos de GFAP são preditivos para o risco de neurodegeneração, estando elevados em pessoas com DA,⁸² e, quando combinados com fatores como idade, sexo e presença do alelo ApoE, conseguem distinguir indivíduos com placas amiloides daqueles sem placas com alta precisão.⁸³ A formação dos principais biomarcadores para a DA e seu escoamento através da BHE estão ilustrados na Figura 7.

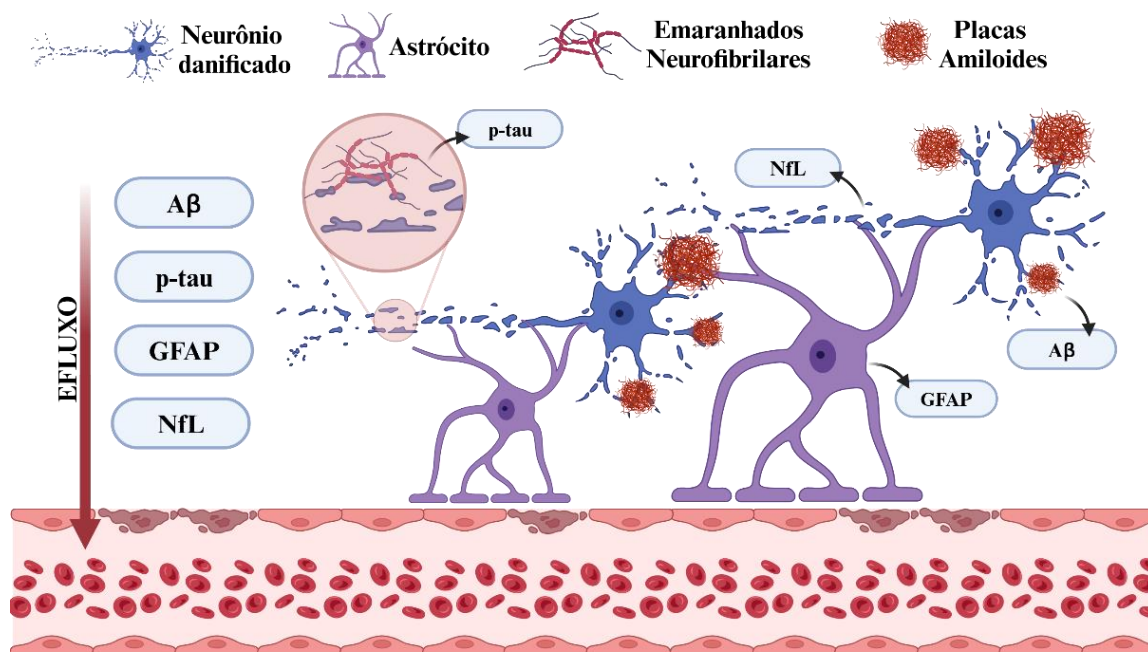


FIGURA 7. Expressão e escoamento de biomarcadores da doença de Alzheimer do cérebro para a corrente sanguínea. Criada usando BioRender.com

1.7. Tratamentos para a doença de Alzheimer

Atualmente, por possuir um diagnóstico tardio, a intervenção na doença de Alzheimer é feita através de medicamentos que aliviam os sintomas, mas não impedem a progressão da doença. Até então, a DA não tem cura. Os principais medicamentos visam combater os efeitos debilitantes que a DA impõe sobre a memória e a cognição, melhorando a qualidade de vida desses pacientes.

Esses medicamentos foram inicialmente implementados com base nas hipóteses colinérgica e glutaminérgica. Ambas propõem que um desequilíbrio no metabolismo desses neurotransmissores são os responsáveis pelo declínio cognitivo em pessoas com DA.⁸⁴

A galantamina,⁸⁵ a rivastigmina⁸⁶ e o donepezil⁸⁷ são três medicamentos que atuam como inibidores das enzimas

acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, responsáveis pela degradação da acetilcolina, um neurotransmissor ligado às funções como memória e cognição. Inibir a quebra desse neurotransmissor é essencial para manter níveis equilibrados e garantir alívio do declínio cognitivo. Entretanto, efeitos colaterais como náuseas e problemas gastrointestinais levam ao abandono do tratamento.⁸⁸

Já a memantina, medicamento aprovado para uso em 2003, atua na via glutamínica, bloqueando a ativação dos canais iônicos N-metil-d-aspartato (NMDA) de forma controlada, isso reduz a permeabilidade da Ca^{2+} e previne a liberação de indutores apoptóticos. No entanto, ensaios clínicos com memantina no tratamento do Alzheimer moderado ao grave não atingiram as expectativas.⁸⁹

Outra classe de medicamentos aprovados para o tratamento da DA são os anticorpos monoclonais, que atuam facilitando o processamento das espécies amiloidogênicas do peptídeo A β . O aducanumab (Aduhelm™, Biogen) foi o primeiro fármaco aprovado para a DA desde a memantina em 2003. No entanto, sua aprovação ocorreu apesar de resultados conflitantes em relação à eficácia e segurança, além de um custo anual de US\$ 56.000,00 por paciente, estabelecido pela Biogen.⁹⁰

Os anticorpos mais recentes são o donanemabe e o lecanemab, da classe imunoglobulina G1 (IgG1). O donanemabe está direcionado contra a forma truncada e modificada do A β insolúvel, atuando principalmente nos depósitos fibrilares,⁹¹ enquanto o lecanemab é projetado para reconhecer as formas solúveis e tóxicas do A β .⁹² Ambos buscam auxiliar na remoção do excesso de placas e oligômeros solúveis por meio da fagocitose mediada pela microglia.

Apesar dos avanços, esses tratamentos têm limitações significativas. São eficazes nas fases iniciais da doença e têm um efeito modesto na melhora dos sintomas, além de não interromperem completamente a progressão do declínio cognitivo.⁹³ Somado a isso, estão associados a efeitos colaterais graves, como edema cerebral e micro-hemorragias, chamados de ARIA (anormalidades relacionadas ao amiloide detectadas em exames de imagem).⁹⁴ O custo elevado desses medicamentos e a infraestrutura necessária para sua administração também limitam o acesso, principalmente em países de baixa e média renda. Isso reforça a urgência de mais pesquisas para desenvolver terapias acessíveis, eficazes e seguras.

1.8. Complexos de Ru(II)

Um agente teranóstico é uma molécula capaz de fornecer simultaneamente informações diagnósticas e atividade terapêutica, oferecendo uma abordagem integrada e eficiente no tratamento de diversas enfermidades. Essa combinação permite o avanço da medicina personalizada, com diagnóstico precoce e possibilidade de ajustes finos em terapias com um nível de controle que as ferramentas atuais não podem atingir.⁹⁵

No caso da doença de Alzheimer, os depósitos de peptídeo A β são uma marca patológica, mas também são considerados um alvo terapêutico. Detectar precocemente as espécies iniciais de agregação de A β é essencial para aumentar a eficácia terapêutica, já que os fármacos atuais geralmente são administrados em estágios avançados da doença.⁹⁶ Nesse cenário, complexos metálicos têm ganhado destaque

como plataformas teranósticas, devido à sua capacidade de se ligar seletivamente à biomoléculas, alterar sua resposta emissiva na presença de alvos biológicos e modular processos patológicos como a agregação proteica, o estresse oxidativo e o desequilíbrio da homeostase metálica.⁹⁷⁻⁹⁹

Entre os metais de transição estudados, os complexos de Ru(II) surgem como candidatos promissores para aplicações teranósticas em doenças neurodegenerativas. Sendo um metal de transição do segundo período, denso e pesado, o átomo de Rutênio apresenta forte acoplamento spin-órbita ($J = \sum L, S$), resultado da interação entre o movimento angular dos elétrons (m_s) e o movimento angular orbital (m_L), favorecendo a conversão entre estados excitados com diferentes multiplicidades de spin.¹⁰⁰ Isso é fundamental para a geração de espécies excitadas com longo tempo de vida, úteis tanto para processos terapêuticos quanto para técnicas de imagem. Os complexos polipiridínicos de Ru(II) exibem emissão na região do infravermelho próximo, evitando interferência com a emissão e absorção de biomoléculas endógenas, melhorando significativamente a resolução e profundidade na aquisição de imagens biológicas.¹⁰¹ Além disso, possuem elevada estabilidade térmica e fotoquímica, podendo ter suas propriedades ajustadas pela modificação dos ligantes coordenados ao centro metálico.

Outro ponto relevante é a presença de um par redox Ru(II)/Ru(III) altamente estável, que permite a participação desses complexos em processos redox fisiológicos sem perda estrutural. Dessa forma, os complexos de Ru(II) se configuram como plataformas multifuncionais ideais para aplicações teranósticas, unindo diagnóstico sensível, imagem de alta resolução e ação terapêutica dirigida, com grande

potencial para o tratamento e monitoramento da Doença de Alzheimer e outras condições neurodegenerativas.

Os complexos polipiridínicos de Ru(II), foco deste trabalho, são amplamente utilizados como sondas luminescentes. Um exemplo é o $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ (onde bpy = 2,2'-bipiridina e dppz = dipirido[3,2-a:2',3'-c]-fenazina), um dos primeiros complexos de Ru(II) utilizados para detectar a agregação do A β .¹⁰² Além disso, esses complexos também atuam como inibidores de agregação, como no caso do *fac*- $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2(\text{N}^1\text{-thz})]$, que forma um intermediário estável A β -Ru, bloqueando a autoagregação do A β após coordenar-se a resíduos de histidina.¹⁰³

Esses compostos têm aplicações em diversas áreas, desde a conversão de energia solar até intercaladores de DNA. Complexos polipiridínicos de Ru(II) podem ser fotoativados, para dissociação controlada de ligantes lábeis ou para geração de EROs.¹⁰⁴ Por exemplo, a fotoativação do complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ leva à desfragmentação de agregados estáveis do peptídeo A β , gerando fragmentos menores e menos tóxicos.¹⁰⁵

Já o complexo $[\text{Ru}(\text{bxbg})]^{2+}$ demonstrou valores de inibição da acetilcolinesterase em taxas semelhantes aos fármacos aprovados pela FDA.¹⁰⁶ E o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{Apy})]^{2+}$ mostrou efeito antioxidante, além de proteger células PC12 contra os danos citotóxicos do A β ,¹⁰⁷ mostrando a versatilidade dos complexos de rutênio.

As pesquisas utilizando complexos de rutênio tem ganhado interesse nas últimas décadas, devido a sua baixa toxicidade, liberação controlada de fármacos, diferentes mecanismos de ativação, alta atividade biológica e possuem estrutura facilmente modificável,

permitindo a investigação específica sobre os mecanismos de progressão da DA.^{108,109} A Figura 8 resume os possíveis usos de complexos de Rutênio em diferentes abordagens para doenças neurodegenerativas.

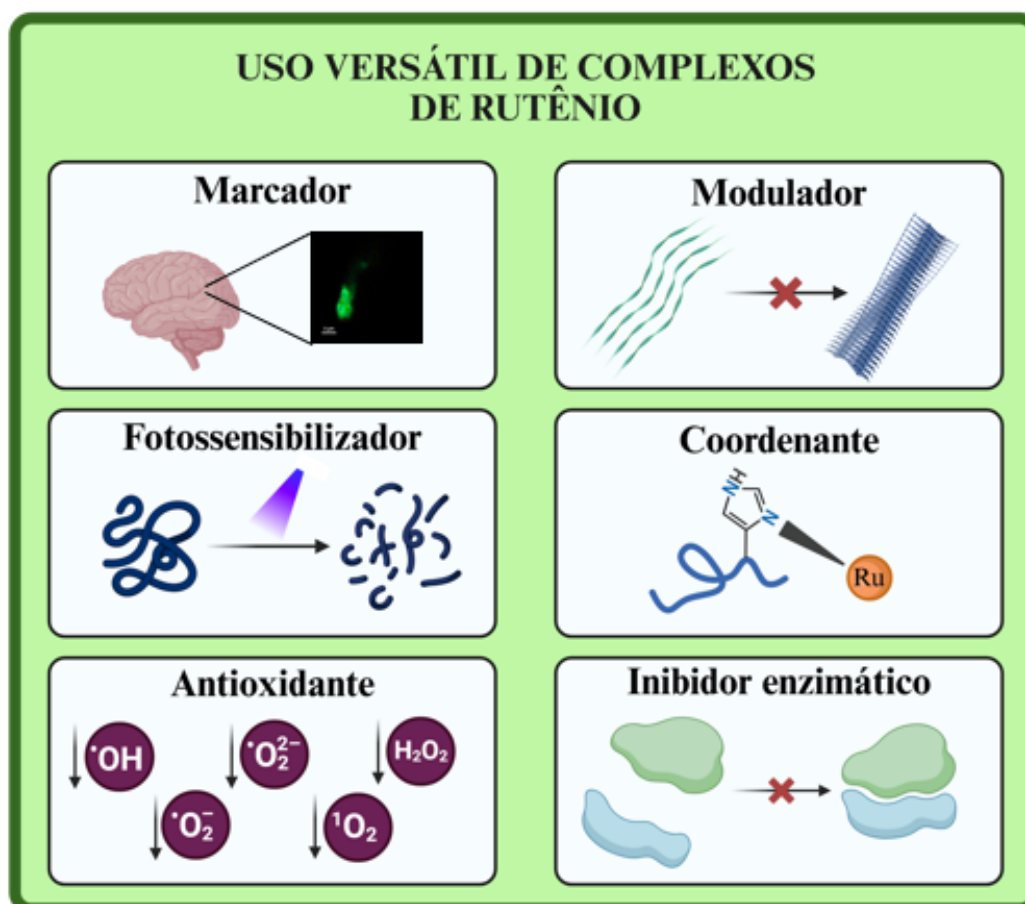


FIGURA 8. Usos possíveis dos complexos de Rutênio em diversas vertentes para tratamento e diagnóstico da doença de Alzheimer. Criada usando BioRender.com

1.9. Os ligantes 3,4Apy e pNDIp

Este trabalho propõe a aplicação dos complexos *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(3,4\text{Apy})]^{2+}$ (RuApy) e *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pNDIp})](\text{PF}_6)_2$ (RuNDI) como moduladores no processo de agregação do peptídeo A β .

O ligante 3,4-diaminopiridina (3,4Apy) é um bloqueador de canais de potássio, utilizada principalmente no tratamento da síndrome de Lambert-Eaton, onde promove a liberação aumentada de acetilcolina nas terminações nervosas e melhora a transmissão neuromuscular.^{110,111} No entanto, seu uso pode levar a efeitos adversos relacionados à hiperexcitabilidade do sistema nervoso, como convulsões, tremores, insônia e ansiedade, especialmente em doses elevadas.¹¹² Nesse contexto, o uso de complexos de rutênio como plataformas para liberação controlada de 3,4Apy representa uma estratégia promissora ao permitir a ativação seletiva do fármaco por estímulos específicos, como luz ou variações do microambiente celular.¹¹³

Já o ligante pNDIp envolve a adição de duas unidades de fenantrolina à estrutura central da naftaleno diimida (NDI), constituindo um sistema molecular plano e altamente conjugado, com propriedades eletrônicas e fotofísicas semelhantes às do corante ANS (1-anilino-8-naftalenossulfonato).^{114,115} Espera-se que assim como o ANS, o pNDIp apresente afinidade por regiões hidrofóbicas expostas em proteínas agregadas. Essa preferência pelo ambiente hidrofóbico das proteínas permite que o ligante se insira em domínios específicos do A β durante sua conversão de formas solúveis para agregados tóxicos, servindo tanto como marcador fluorescente quanto como possível modulador da agregação.^{115,116} Quando coordenado a centros metálicos como o rutênio, o sistema pNDIp pode ainda incorporar funcionalidade fotoativa, oferecendo uma alternativa para o desenvolvimento de sondas e agentes terapêuticos direcionados à detecção precoce e ao controle da formação de placas amiloides na doença de Alzheimer.

1.10. Hipótese

O estudo de complexos de Ru(II) tem ganhado destaque por sua versatilidade e surgem como candidatos para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a doença de Alzheimer. Os depósitos amiloides são uma marca patológica da DA, mas também são considerados alvos terapêuticos, afinal são os responsáveis por desencadear diversos desequilíbrios no ambiente cerebral.

Portanto, a hipótese do presente trabalho é de que os complexos *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)]²⁺ e *cis*-[Ru(phen)₂(pNDIp)](PF₆)₂ sejam capazes de interagir com o peptídeo Aβ, modulando seu processo de agregação e, conseqüentemente, contribuindo para a inibição da formação ou para a desestabilização de depósitos fibrilares associados à patologia da doença de Alzheimer. Considerando a versatilidade estrutural e eletrônica desses complexos, bem como sua capacidade reconhecida de interagir com biomoléculas, acredita-se que eles possam atuar em diferentes etapas da agregação do Aβ, seja por meio de ligações específicas, interferência estérica ou alteração do microambiente químico. Dessa forma, a síntese e caracterização desses compostos visa avaliar seu potencial como agentes moduladores da agregação amiloide, contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a doença de Alzheimer.

2.

O complexo *cis*-
[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]²⁺ como
agente modulador na agregação
cruzada entre o peptídeo Aβ e
insulina humana

*"O otimista é um tolo. O pessimista, um chato.
Bom mesmo é ser um realista esperançoso."*

-Ariano Suassuna

2.1. Contextualização

2.1.1. Doenças Amiloides

O acúmulo de proteínas mal dobradas não é uma característica exclusiva da doença de Alzheimer. Diversas outras condições estão associadas à formação de agregados insolúveis ricos em folhas- β ,¹¹⁷ incluindo doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson e esclerose lateral amiotrófica, além de condições não relacionadas ao SNC, como amiloidose atrial, cataratas e diabetes tipo II.¹¹⁸

Pesquisas recentes observaram a deposição de várias proteínas amiloides no mesmo tecido ou órgão, sugerindo uma conexão entre diversas doenças.¹¹⁹ A presença de uma ou mais dessas condições em um indivíduo está associada a quadros mais graves e de progressão acelerada. Além disso, indivíduos diagnosticados com uma doença amiloide possuem maior suscetibilidade de desenvolver outra.¹²⁰

A agregação cruzada ou heterogênea de proteínas amiloides pode representar uma via importante para a compreensão dos impactos causados pelas doenças amiloides, embora os mecanismos exatos por trás desses processos ainda não sejam totalmente conhecidos.

2.1.2. Diabetes e Insulina

A Diabetes, assim com a DA, está relacionada com a formação de fibrilas amiloides. O Polipeptídeo Amiloide das Ilhotas Humanas (hIAPP) é secretado com junto com a insulina, entretanto a hIAPP tende

a formar agregados insolúveis responsáveis pela disfunção e morte das células β -pancreáticas.¹²¹

Segundo a OMS, a Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica, hereditária ou adquirida, que afeta a produção ou a eficácia da insulina, elevando os níveis de glicose no sangue. Estima-se que, até 2045, 700 milhões de pessoas serão afetadas pela DM, que é uma das principais causas de morbidade prematura e se torna mais comum com o envelhecimento.¹²² A Diabetes Tipo 2 (DT2) representa 90% dos casos e, em seus estágios iniciais, é marcada pela resistência à insulina, levando à hiperestimulação das células β -pancreáticas, iniciando um estado pré-diabético. Com o tempo, a exaustão dessas células resulta no desenvolvimento da DT2.¹²³

A insulina é um hormônio peptídico que, juntamente com seu receptor, regula os níveis de glicose no sangue. Por isso é essencial e indispensável no tratamento da Diabetes.

2.1.3. A doença de Alzheimer e a Diabetes Tipo II

Vários estudos relacionam a DT2 ao comprometimento cognitivo e à DA. A análise *post-mortem* de cérebros diabéticos mostrou diversos danos estruturais aos tecidos, atribuídos a neuroinflamação, neurodegeneração e disfunção cognitiva progressiva.¹²⁴

Pessoas acometidas com DT2 possuem maior chance de desenvolver demência e doença de Alzheimer. Diversos aspectos parecem estar envolvidos nessa relação, como lesões vasculares,

neuroinflamação, aumento no estresse oxidativo, resistência e degradação da insulina.¹²⁵

Estes estudos, somados a investigações em nível molecular e clínico, indicam uma relação direta entre a DA e a DT2. Por exemplo: (1) Receptores de insulina estão presentes em grandes quantidades no SNC, desempenhando papel fundamental na memória e aprendizagem, principalmente no córtex e no hipocampo, que são os maiores consumidores de glicose do corpo humano;¹²⁶ (2) Oligômeros do peptídeo A β promovem resistência à insulina, pois causam danos deletérios aos receptores dos neurônios, prejudicando o metabolismo de glicose;¹²⁷ (3) Os danos neurovasculares causados pela deficiência de insulina levam ao mau processamento do peptídeo A β no organismo e conseqüentemente à sua agregação;¹²⁷ (4) A presença de doenças metabólicas aumenta a produção do A β ;¹²⁸ (5) Má sinalização da insulina leva a hiperfosforilação da tau;¹²⁹ (6) Aumento nos níveis de A β_{42} no CSF em pessoas com altas taxas de insulina no sangue;¹³⁰ (7) Drogas antidiabéticas mostraram caráter protetivo para danos neurológicos em camundongos que expressam uma ou ambas as doenças.¹³¹

2.1.4. Agregação cruzada entre o peptídeo A β e insulina humana

A agregação cruzada tem sido alvo de estudos nos últimos anos devido às semelhanças e relações que essas proteínas apresentam entre si. Além dos aspectos estruturais, busca-se compreender os mecanismos de formação de fibrilas, uma vez que a agregação cruzada parece ocorrer

por meio do mecanismo de nucleação secundária, no qual o processo de formação de fibrilas de uma proteína influencia diretamente a agregação de outra.¹³² A Figura 10 elucidada, de forma simples, o mecanismo de agregação homogênea e cruzada para proteínas amiloides.

O entendimento dessas interações também pode fornecer informações sobre a presença de uma ou mais proteínas em depósitos amiloides e qual a relação desses agregados com o aumento do risco de desenvolvimento de outras doenças metabólicas.¹³³

A insulina, foco deste capítulo, desempenha um papel importante no cérebro. Estudos mostram que ela tem um efeito protetor sobre as sinapses, ajudando a combater a toxicidade do peptídeo A β , além de melhorar o desempenho cognitivo.¹³⁴ No entanto, também há evidências que sugerem que o tratamento com insulina em pessoas com DT2 pode aumentar o risco de desenvolver Alzheimer.^{135,136}

A nível molecular, estudos demonstraram que a insulina e o peptídeo A β regulam mutuamente sua produção, função e degradação.¹³⁷ Além disso, os agregados de A β promovem a fibrilação da insulina, embora esses agregados tenham se mostrado menos tóxicos do que os oligômeros de A β .¹³⁸

Dado a necessidade de entendimento do processo de interação entre diferentes proteínas amiloidogênicas, propõe-se o uso do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)](PF₆)₂ como modulador no processo de agregação heterogênea entre o peptídeo A β e insulina humana. O complexo RuApy consegue identificar espécies amiloides do peptídeo A β ₁₋₄₀ e fragmentos A β ₁₋₂₈, A β ₂₉₋₄₀, A β ₁₁₋₂₂. E ainda é capaz de prejudicar o processo de fibrilação, protegendo células PC12.^{139,140}

2.2. Objetivos do capítulo

- Sintetizar e caracterizar o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)](PF₆)₂ utilizando técnicas de espectroscopia de RMN (¹H) e espectroscopia de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS);
- Caracterizar o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)](PF₆)₂ por técnicas espectroscópicas de absorção eletrônica na região UV-Vis e luminescência no estado estacionário;
- Investigar as influências do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)](PF₆)₂ na agregação heterogênea do peptídeo Aβ₄₂ *in vitro* na presença de insulina humana, utilizando técnicas de luminescência no estado estacionário, dicroísmo circular, microscopia de força atômica (AFM) e microscopia de fluorescência resolvida no tempo (FLIM);
- Avaliar a toxicidade das espécies formadas na agregação homogênea e heterogênea em células de neuroblastoma SH-SY5Y.

2.3. Materiais e métodos

2.3.1. Reagentes

São de procedência Sigma-Aldrich todos os reagentes utilizados para a síntese dos complexos de Ru(II) – RuCl₃.H₂O; 1,10-fenantrolina (phen); Cloreto de Lítio (LiCl); 3,4-diaminopiridina (3,4Apy) e hexafluorofosfato de amônio (NH₄PF₆). São de procedência Synth todos os sais envolvidos na preparação do tampão fosfato salino (PBS) - Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄); Fosfato de potássio

bibásico (K_2HPO_4); Cloreto de sódio (NaCl) e Cloreto de potássio (KCl). Os solventes orgânicos possuem grau de pureza HPLC e as soluções aquosas deste trabalho foram feitas utilizando água MilliQ.

2.3.2. Síntese do complexo *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂]

O complexo precursor Ru(phen)₂Cl₂ foi sintetizado em 15 mL de DMF previamente destilado e desaerado. Para a síntese, os seguintes reagentes foram adicionados na seguinte ordem:

(1) 200 mg de RuCl₃·H₂O (0,76 mmol);

(2) 1,10-fenantrolina em excesso de 2x + 10% (289,5 mg - 1,60 mmol);

(3) 230 mg de LiCl (5,40 mmol).

A reação foi conduzida sob refluxo e agitação constante por 8 horas, em atmosfera de N₂ e ausência de luz. Após esse período, o produto da reação foi filtrado em funil de sílica. O sólido preto obtido foi lavado com água gelada até que a água de lavagem ficasse incolor, seguido de lavagem com acetona gelada e secagem à vácuo. O rendimento médio da síntese foi de 60%.

2.3.3. Síntese do complexo *cis*- [Ru(phen)₂(3,4Apy)₂]

A síntese do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(3,4Apy)₂] foi realizada conforme a literatura e o protocolo do grupo (Figura 9).¹⁴¹ Para isso, em uma mistura de 12 mL de etanol/água (1:1) previamente desaerado, foram adicionados:

(1) 150 mg (0,284 mmol) do precursor $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$ e

(2) 61,5 mg (0,568 mmol) de 3,4-diaminopiridina.

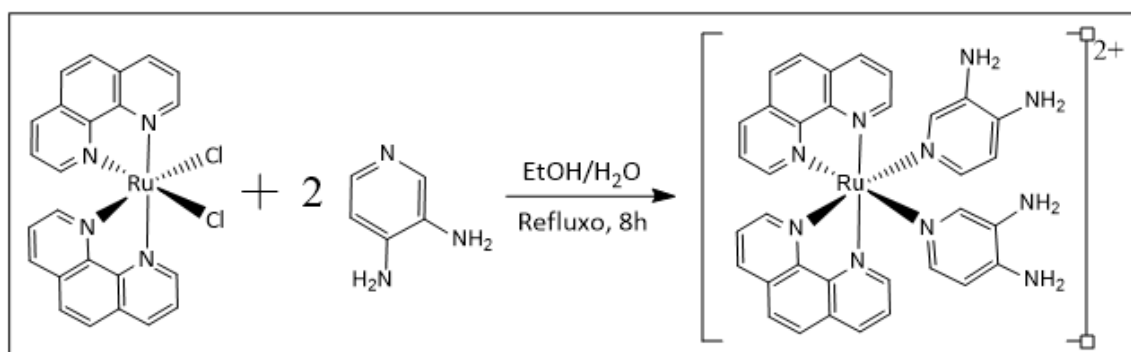


FIGURA 9. Esquema de rota sintética para obtenção do complexo RuApy.

A reação foi conduzida sob refluxo e agitação constante por 8 horas, em atmosfera de N_2 e na ausência de luz. Após esse período, a reação foi filtrada a vácuo, ainda quente, para remover qualquer sólido do meio reacional. Ao filtrado, foram adicionados 92 mg (0,564 mmol) de hexafluorofosfato de amônio (NH_4PF_6), e a mistura foi deixada em repouso sob refrigeração durante a noite para permitir a precipitação. O produto foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada. O sólido vermelho escuro foi seco a vácuo e o rendimento médio da síntese foi de 60%

2.3.4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos no espectrômetro BRUKER DXR 400 MHz do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. Para isso, solubilizou-se 3 mg do produto obtido no item 2.3.3. em 600 μL de DMSO-d_6 .

2.3.5. Espectroscopia de Absorção no UV-visível

Os espectros de absorção eletrônica na região do UV-vis foram obtidos através de um espectrofotômetro Agilent 8453A. Para tal, foram utilizadas celas de quartzo de caminho ótico 10 mm e volume 3.5 mL.

2.3.6. Espectroscopia de Luminescência no Estado Estacionário

Os espectros de emissão foram obtidos no espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC com lâmpada de xenônio de alta pressão (150 W) e fotomultiplicadora do tipo R928. Para os experimentos de caracterização do complexo foram utilizadas celas de quartzo de quatro lados de caminho ótico 10 mm e volume 3.5 mL. Para os ensaios *in vitro* com o peptídeo β A e Insulina humana, foram utilizadas celas de quartzo de caminho ótico 10 mm x 4 mm e volume de 700 μ L.

2.3.7. Preparo do Peptídeo A β ₄₂

A β ₁₋₄₂ (10017-1, GenScript, Piscataway, NJ, EUA) foi preparado de acordo com protocolo previamente descrito.¹⁴² 1 mg do peptídeo liofilizado foi dissolvido em 150 μ L de HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol) e sonicado por 10 minutos à baixa temperatura. Alíquotas de 10 μ L foram transferidas para vials de vidro e o solvente foi removido por evaporação com um fluxo suave de N₂. Em seguida, os filmes obtidos foram secos a vácuo e armazenados a -20°C.

Os filmes de A β foram ressuspensos em PBS (133 mM NaCl, pH 7,4) para obter uma solução de 20 μ M. A concentração foi confirmada por absorção em um NanoDrop (MM = 4,51 kDa, ϵ_{280} nm = 1,49).

2.3.8. Preparo da Insulina Humana

10 mg de insulina humana (I2643, Sigma Aldrich) foram dissolvidas em 1 mL de solução de HCl (100 mM NaCl, pH 2,0) e armazenada a -20 °C. O estoque de insulina foi diluído para 20 μ M em PBS (133 mM NaCl, pH 7,4). A concentração foi confirmada por absorção (ϵ_{278} = 6080 mol⁻¹.L.cm⁻¹).

2.3.9. Protocolo de Agregação

As agregações homogênea e heterogênea foram realizadas incubando A β (20 μ M), Insulina (20 μ M), A β /Insulina (1:1) e A β /Insulina/RuApy (1:1:1) em tampão PBS, pH 7,4 à 37 °C por 24 horas.

2.3.10. Ensaio de Fluorescência com Tioflavina-T

A Tioflavina-T (ThT) (Sigma Aldrich) foi dissolvida em tampão PBS. Para medir a fluorescência de ThT, a concentração foi ajustada para 20 μ M na presença de A β_{1-42} a uma temperatura de 37°C por 480 minutos. A fluorescência de ThT foi medida usando um espectrofluorímetro (Shimadzu RF-5301 PC) com um filtro de excitação de 440 nm. Os espectros de emissão foram registrados em uma faixa de 460 - 700 nm.

2.3.11. Ensaio de Fluorescência Intrínseca

A emissão intrínseca do aminoácido tirosina (Tyr), presente na estrutura do β A e da insulina, foi medida em um espectrofluorímetro (Shimadzu RF-5301 PC) colocando 400 μ L de cada amostra em uma cela de 10x7 mm e com a excitação da amostra a 270 nm. Os espectros de emissão foram registrados em uma faixa de 285 - 500 nm.

2.3.12. Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos junto ao Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” do Departamento de Física da Universidade de São Paulo – São Carlos, em colaboração com a Prof.^a Dr.^a Ana Paula Ulian de Araújo.

Para monitorar as estruturas secundárias formadas na agregação homogênea e heterogênea de A β /Insulina (20 μ M) utilizou-se um espectropolarímetro Jasco-815. Para isso, 200 μ L das soluções de monômeros e fibrilas recém preparadas foram colocadas em uma cela de quartzo despolarizado de caminho ótico 5 mm. Os espectros de desvio da luz polarizada foram adquiridos em uma faixa de 200-270 nm a 200 nm/min, com largura de banda de 1 nm e 15 acúmulos.

2.3.13. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A morfologia das estruturas formadas na agregação homogênea de A β (20 μ M) e na agregação cruzada entre A β /Insulina (1:1) e A β /Insulina/RuApy (1:1:1) foi monitorada utilizando um sistema AFM MultiMode8 (Brucker) no Laboratório Nacional de Nanotecnologia

(LNNano) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM; proposta 20221197).

Para isso, 10 μL de soluções recém preparadas das proteínas (0h e 24h de incubação à 37 °C) foram colocados em um substrato de mica recentemente desfolhado para aderir por 15 minutos. As amostras foram lavadas três vezes com água deionizada, para remover o excesso de sal do tampão e proteínas fracamente ligadas. Em seguida, as folhas de mica foram secas por 2 horas com um fluxo suave de N_2 . As imagens foram adquiridas com resolução de 512x512 pixels a 1 Hz, com varreduras de 5x5 μm , 2x2 μm e 1x1 μm em diferentes regiões, e os dados foram processados com o software Gwiddion.

2.3.14. Microscopia de Imagem por Tempo de Vida de Fluorescência (FLIM)

As imagens de FLIM foram obtidas utilizando um MicroTime 200 (PicoQuant) acoplado a um microscópio invertido Olympus IX71 no Laboratório de Fotobiofísica da USP – Ribeirão Preto. As imagens foram coletadas com um pulso de laser picosegundo a 440 nm. Para as análises, 20 μL de cada amostra foram aplicados em uma lâmina de vidro de 20 mm x 20 mm (Knittel Glass, Alemanha). A emissão de fluorescência foi capturada com um objetivo de imersão em água de 60x, utilizando um filtro dicróico para bloquear a dispersão da luz. A coleta foi feita por um único fotodiodo de avalanche (SPAD), empregando o método de contagem de fótons únicos correlacionados ao tempo (TCSPC). As amostras foram analisadas no plano XY com o eixo Z fixo, e as imagens foram processadas com o software SymPhoTime (PicoQuant) com resolução de 512x512 pixels.

2.3.15. Viabilidade Celular

O ensaio de MTT para as células SH-SY5Y foi realizado no Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN-UFSCar) em colaboração com a Prof.^a Dr.^a Márcia Regina Cominetti. As células de neuroblastoma foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium e Ham's F12 (DMEM/F12, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (FBS), 1% de piruvato de sódio, 10% de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA) em um incubador umidificado com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C, em frasco específico para cultura celular, até atingirem 80% de confluência. Após esse tempo, 2 mL de tripsina 10% foram adicionados ao frasco e as células foram coletadas em um tubo limpo, centrifugadas por 10 minutos a 1200 RPM. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em DMEM/F12 para ser semeado em uma placa de 96 poços a 3x10⁴ células/poço e deixado aderir por 24 horas em incubadora a 37 °C. Em seguida, as células foram tratadas com soluções de βA₁₋₄₂ (20 μM), Insulina (20 μM), Aβ/Insulina (1:1:1), Aβ/RuApy (1:1), Insulina/RuApy (1:1), Aβ/Insulina/RuApy (1:1:1) e retornaram ao incubador por 24 e 48 horas. A viabilidade celular foi avaliada colocando 100 μL de MTT (0,75 mg/mL) para metabolizar a 37 °C. Após 3 horas, a solução foi removida e 100 μL de DMSO foram adicionados à temperatura ambiente até completa lise celular. A absorbância do formazan foi medida em um leitor de microplaca (Thermo Plate TP-READER) a 540 nm. As células viáveis foram calculadas pela seguinte equação:

$$\% \text{ viabilidade} = (\text{D.O.}/\text{D.O. controle}) \times 100\%$$

2.4. Resultados e Discussão

2.4.1. Ressonância Magnética Nuclear

A síntese e caracterização do complexo RuApy já é bem estabelecida na literatura. A espectroscopia de RMN foi utilizada para confirmar a obtenção do complexo. A Figura 10 mostra o complexo RuApy e destaca os hidrogênios em sua estrutura.

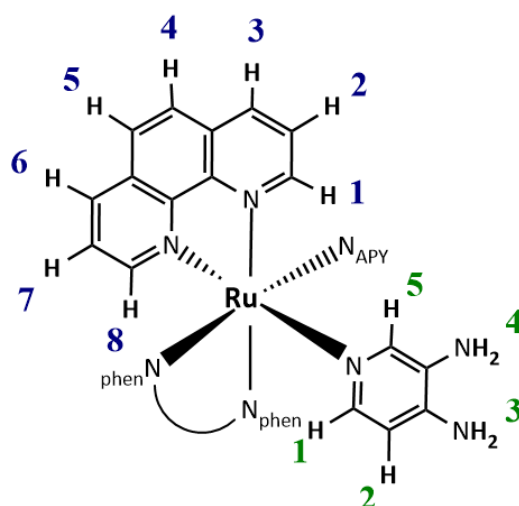


FIGURA 10. Atribuição dos hidrogênios presentes na estrutura do complexo RuApy

A Figura 11 mostra o espectro de RMN de ¹H obtido para o complexo RuApy em DMSO-d₆.

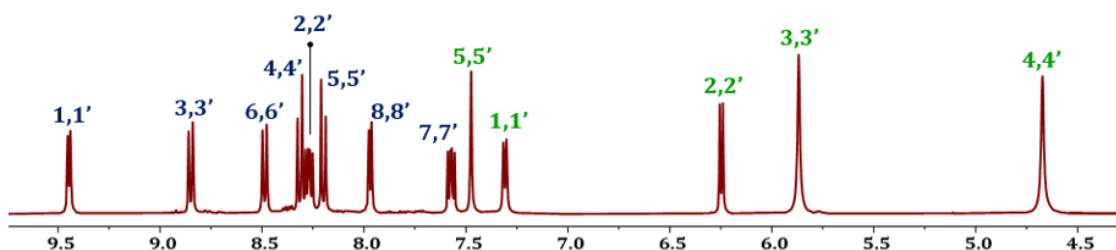


FIGURA 11. Espectro de RMN de ¹H para a região desblindada do complexo RuApy

Os sinais característicos das diaminopiridinas aparecem na região entre δ 4.50 – 7.50 ppm e os sinais das fenantrolinas coordenadas ao metal aparecem entre δ 7.5 – 9.5 ppm. As atribuições para cada hidrogênio, deslocamento químico (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (Hz) e a integração dos sinais de RMN estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Atribuições dos espectros de RMN de ^1H obtidos para o complexo RuApy em DMSO- d_6 . Os respectivos hidrogênios estão apresentados em deslocamento químico (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (Hz) e a quantidade de hidrogênios.

| | Nº | ^1H |
|---------------|-------|------------------|
| 3,4Apy | 1, 1' | 7.31; d (6.1); 2 |
| | 2, 2' | 6.24; d (6.1); 2 |
| | 3, 3' | 5.86; s; 4 |
| | 4, 4' | 4.67; s; 4 |
| | 5, 5' | 7.47; s; 2 |
| phen | 1, 1' | 9.45; d (5.3); 2 |
| | 2, 2' | 8.27; m; 2 |
| | 3, 3' | 8.84; d (8.2); 2 |
| | 4, 4' | 8.32; d (8.8); 2 |
| | 5, 5' | 8.18; d (8.7); 2 |
| | 6, 6' | 8.49; d (8.2); 2 |
| | 7, 7' | 7.55; m; 2 |
| | 8, 8' | 7.97; d (5.2); 2 |

2.4.2. Absorção Eletrônica e Luminescência no Estado Estacionário

O espectro de absorção eletrônica na região do UV-visível obtido para o complexo RuApy em PBS (10 mM, NaCl 137 mM, pH 7.4) está disposto na Figura 12. É possível observar duas bandas características dos complexos polipiridínicos de Ru(II). A primeira banda com máximo em 265 nm ($\epsilon = 68.000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) refere-se à transição de transferência de carga interna, $\pi \rightarrow \pi^*$, das fenantrolinas (ILCT). A segunda banda observada entre o intervalo 350 – 600 nm, com máximos em 450 nm ($\epsilon = 9.300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) e 480 nm ($\epsilon = 9.100 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), refere-se à transição de transferência de carga do metal para o ligante (MLCT) de natureza $d\pi, \text{Ru(II)} \rightarrow \pi^*, \text{phen/Apy}$.

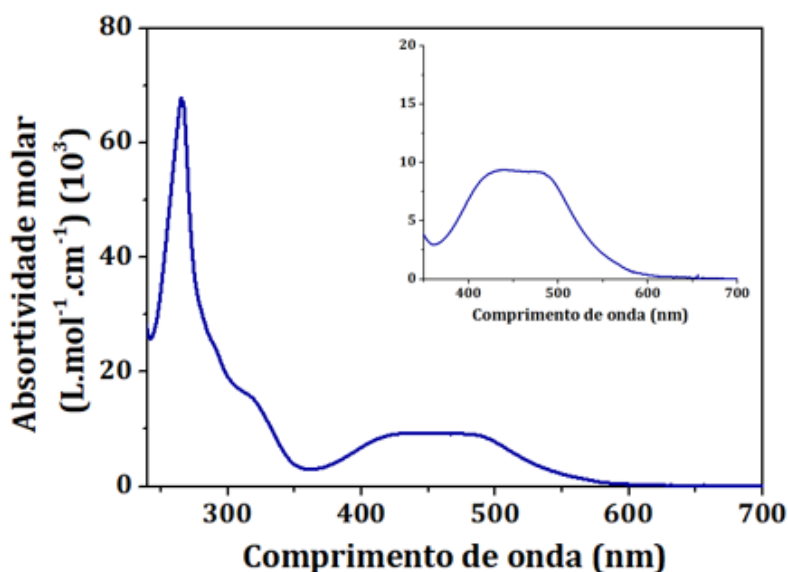


FIGURA 12. Espectro de absorção eletrônica do complexo RuApy (30 μm) em PBS.

O espectro de emissão do complexo RuApy (Figura 13A) apresenta uma banda larga entre 550–850 nm vinda da desativação do estado excitado $^3\text{MLCT}$. O deslocamento de Stokes, que é a diferença entre os

estados energéticos de emissão e excitação do fluoróforo, para o complexo está em torno de 6100 cm^{-1} (Figura 13B)

Quanto maior for a separação dos estados energéticos, menor será a sobreposição dos níveis vibracionais, reduzindo os processos de reabsorção de energia. Essa característica, aliada ao fato de que o complexo RuApy apresenta um máximo de emissão em 650 nm , possibilita seu uso como sonda luminescente, uma vez que evita processos competitivos com biomoléculas que absorvem na região do ultravioleta e emitem luz entre 250 e 450 nm .

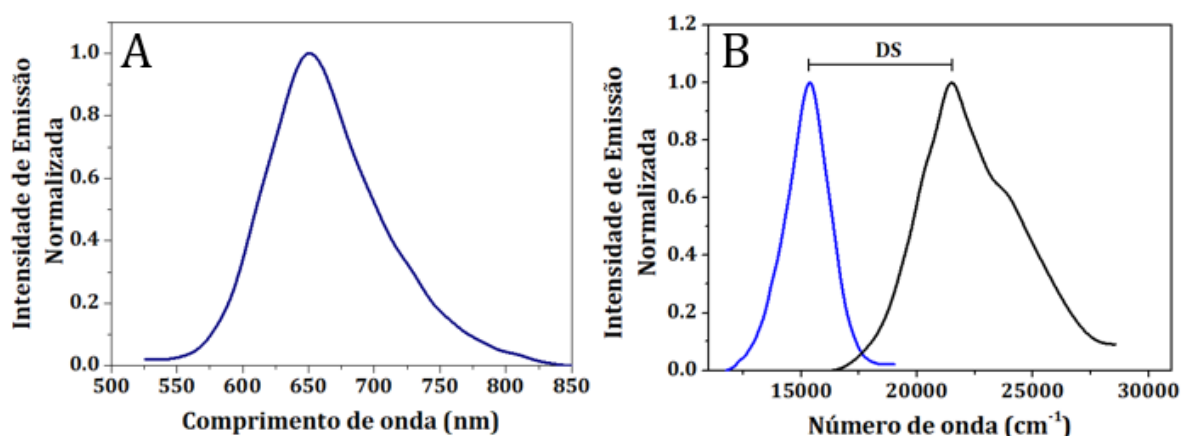


FIGURA 13. Espectros de (A) emissão e (B) de deslocamento de Stokes entre a emissão (azul) e excitação (preto) obtidos para o complexo RuApy.

2.4.3. Agregação Homogênea do Peptídeo $A\beta_{42}$

2.4.3.1. Ensaio de Fluorescência com Tioflavina-T (ThT)

A curva de agregação para o peptídeo $A\beta$ ($20\ \mu\text{mol.L}^{-1}$) foi obtida pelo aumento na resposta luminescente da ThT (1:1) com máximo em 480 nm . Os espectros apresentados na Figura 14A mostram a presença de agregados pré-formados em solução, atingindo a fase de saturação após 3 horas de incubação à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 14B). A ausência da fase de

latência no ensaio de ThT é devido à alta concentração de A β , o que leva a um mecanismo de agregação mais rápido.

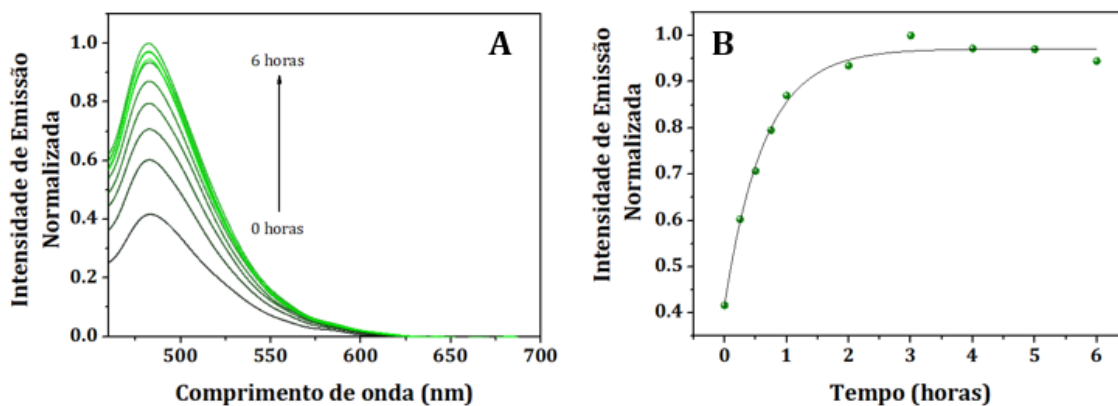


FIGURA 14. Espectros de emissão obtidos para a cinética de agregação do peptídeo A β (20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) utilizando ThT (1:1) como marcador amiloide (A) e a progressão da resposta emissiva da ThT ao longo do tempo (B).

2.4.3.2. Ensaio de Luminescência Intrínseca

À medida que a autoagregação do peptídeo A β_{42} inicia, a emissão da tirosina (Tyr10) em 300 nm (atribuída ao grupo fenólico Tyr-OH) diminui com um aumento concomitante de uma intensa banda de emissão em 340 nm, atribuída ao íon tiosinato (Tyr-O $^-$). É estabelecido que Tyr-O $^-$ é formado pela interação de TyrOH com átomos de oxigênio do tampão fosfato, porém em concentrações acima de 1 mol.L^{-1} ,¹⁴³ e/ou com um grupo receptor de próton de uma cadeia lateral de aminoácido por ligação de hidrogênio.

Estudos utilizando pequenos peptídeos contendo apenas tirosinas e nenhum triptofano, sugerem que a emissão do íon tiosinato seja resultante de uma transferência intramolecular de próton no estado excitado entre o grupo fenólico Tyr-OH e grupos carboxilatos -COO $^-$ de aminoácidos como glutamato e aspartato.¹⁴⁴ O peptídeo A β possui três

resíduos de glutamato (Glu1, Glu7 e Glu23) e três resíduos de aspartato (Asp3, Asp11 e Asp23), todos entre o núcleo hidrofóbico e o N-terminal.

Uma emissão ampla e fraca (450 nm), característica das estruturas folha- β ricas em ligações de hidrogênio, também é detectada, indicando a presença de agregados moleculares. Os espectros obtidos ao longo de 24 horas de agregação do peptídeo A β estão apresentados na Figura 15.

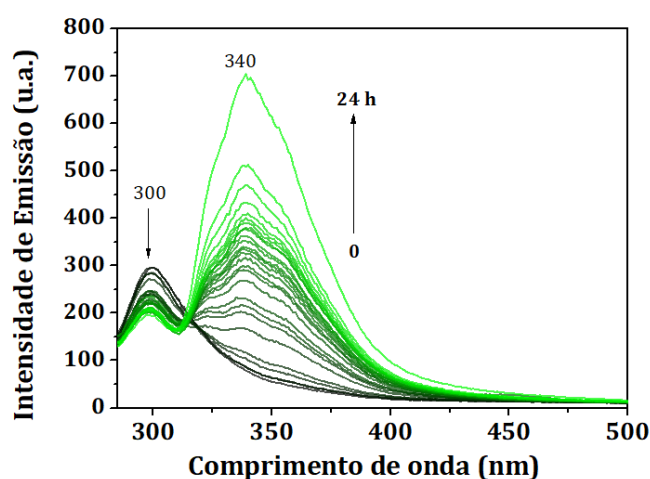


FIGURA 15. Espectros de emissão da Tyr10 obtidos durante 24 horas para a agregação do peptídeo A β .

Estudos recentes sugerem que as mudanças na resposta emissiva da Tyr10 seja uma conversão da sua forma exposta ao solvente, nos monômeros e oligômeros, para a sua forma internalizada nas fibrilas. Processo envolvido na formação das ligações de hidrogênio.^{145,146}

Curiosamente, a formação da banda referente ao íon Tyr-O⁻ é pronunciada após as primeiras horas de agregação, mesmo que o ensaio de luminescência com ThT tenha atingido sua saturação a partir da 3^a hora de agregação. Isso sugere que a propagação das fibrilas pode

continuar formando espécies amiloides mais complexas e que a Tyr10 está relacionada com a formação das ligações de hidrogênio ao longo do eixo de crescimento.¹⁴⁷

2.4.3.3. Dicroísmo Circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) detecta o desvio de luz polarizada por moléculas opticamente ativas, à esquerda ou à direita. Moléculas quirais, como proteínas e ácidos nucleicos possuem essa capacidade, por isso a técnica de CD é comumente utilizada para estudar a estrutura secundária dessas moléculas.

Com intuito de coletar informações sobre as estruturas formadas durante a agregação do peptídeo A β , foram obtidos espectros de dicroísmo circular em três diferentes tempos de incubação (0h, 3h e 24h). Os tempos foram selecionados a partir do monitoramento da ThT e da Tyr10.

Ao primeiro momento é possível notar uma mistura entre a forma randômica do peptídeo A β (200 nm) com sinais de folhas- β , indicando a presença de agregados pré-formados (Figura 16). As mudanças conformacionais observadas nos espectros de CD mostram a conversão para a forma fibrilar com mínimo de absorção em 220 nm característico de folhas- β . Entretanto, 24 horas de incubação à 37 °C levam ao alargamento da banda e um leve aumento na absorção, mostrando que o processo de agregação, apesar da saturação da ThT, continua.

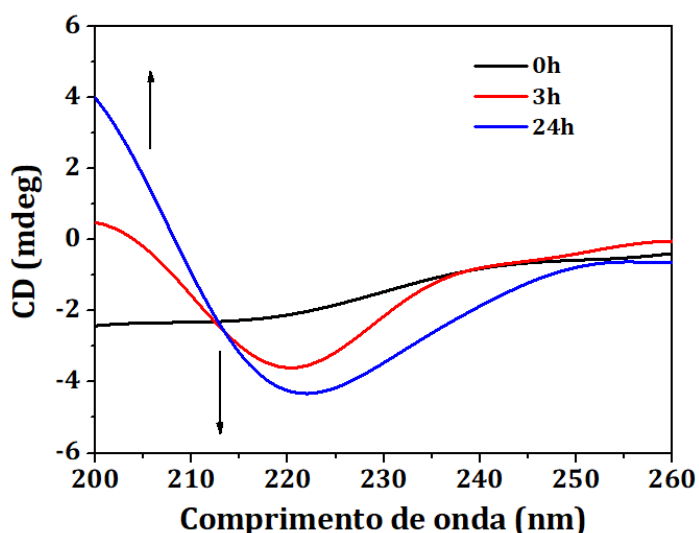


FIGURA 16. Espectros de dicroísmo circular obtidos para a agregação do peptídeo A β em 0h (preto), 3h (vermelho) e 24h (azul).

2.4.3.4. Microscopia de Força Atômica

Para melhor elucidação das estruturas formadas na agregação do A β , imagens de AFM também foram obtidas para tempos representativos (0h, 3h e 24h).

A Figura 17 mostra, no tempo zero, a presença de pequenos agregados pré-formados e estruturas oligoméricas em sua maioria. Após 3h de incubação, tempo de saturação da ThT, é possível observar a formação de fibrilas, ao passo que não se esgotaram as espécies iniciais, característica do equilíbrio formado entre essas espécies.⁴⁸ Já 24h de incubação levaram à formação quase que completa de fibrilas alongadas e retorcidas, confirmando as observações anteriores, de que a agregação dessas espécies continua e a Tyr10 está relacionada com a estabilização dessas estruturas.

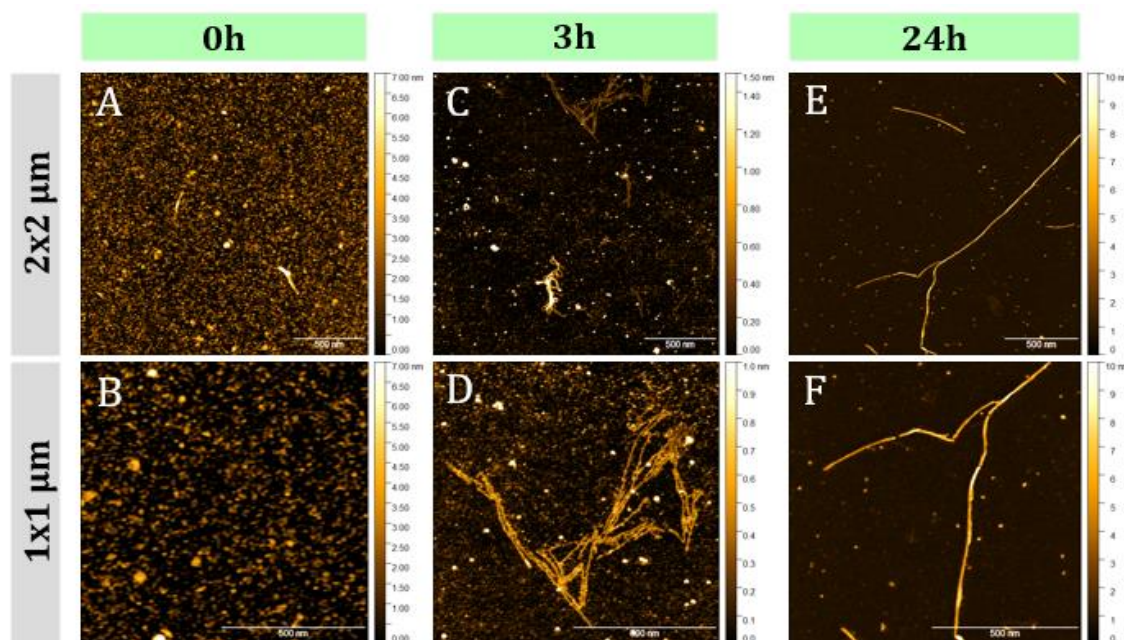


FIGURA 17. Imagens de microscopia de força atômica obtidas durante a agregação do peptídeo A β em (A) e (B) 0 horas; (C) e (D) 3 horas; (E) e (F) 24 horas. As imagens (A); (C) e (E) possuem varredura de 2x2 μ m e as imagens (B); (D) e (F) possuem varredura de 1x1 μ m.

2.4.4. Agregação cruzada: peptídeo A β_{42} , Insulina humana e RuApy

No presente estudo, a influência da Insulina humana (Ins) e do complexo RuApy na agregação do A β_{42} é relatada em termos das seguintes variáveis: Ins/A β_{42} e Ins/RuApy/A β_{42} , em PBS (PBS 10 mM, NaCl 137 mM, pH 7,4). Ao discutir a fibrilação da insulina, é importante observar que o monômero da insulina não se agrega em PBS à 37 °C por 24 horas, como foi confirmado pela espectroscopia de fluorescência e CD.

2.4.4.1. Ensaio de Luminescência Intrínseca

Os espectros de emissão coletados para a agregação-cruzada entre o peptídeo $A\beta_{42}$ e Insulina (Figura 18A) foram dominados pela forte emissão em 300 nm, vindas das tirosinas de ambas as proteínas, e uma fraca banda (450 nm), indicando a presença de ligações de hidrogênio. É notável que após 24 horas de incubação o espectro resultante não exibiu a banda de emissão em 340 nm do ânion $Tyr-O^-$, apesar da formação de ligações de hidrogênio.

Uma explicação razoável para esses resultados é que a cadeia da insulina cria uma obstrução estérica que limita a interação do $A\beta_{42}$ ao redor da Tyr10 e impede a formação de agregados fibrilares. A presença do complexo RuApy no sistema resultou na supressão das bandas do íon $Tyr-O^-$, em 340 nm, e das ligações de hidrogênio, em 450 nm, como mostrado na Figura 18B. Ambos os resultados sugerem inibição no processo de agregação do $A\beta_{42}$.

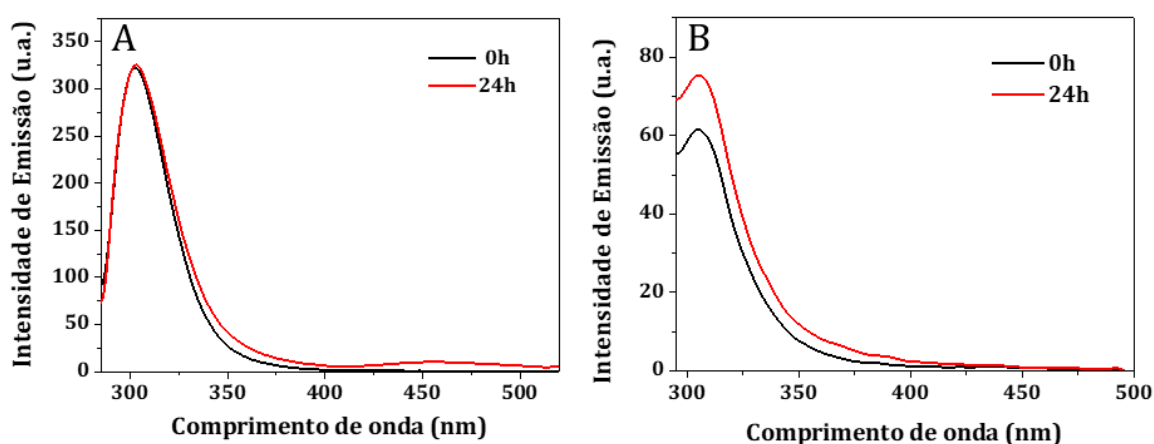


FIGURA 18. Espectros de emissão obtidos para a cinética de agregação cruzada entre (A) $A\beta$ /Insulina e (B) $A\beta$ /Insulina/RuApy

2.4.4.2. Dicroísmo Circular

Após 24 horas de incubação os espectros de CD para a agregação $A\beta$ /Insulina revelaram uma larga banda de absorção com mínimos em 210 nm e 228 nm, que sugerem a formação de estruturas folhas- β , observada também nos espectros de emissão, e a formação de espécies de estrutura randômica (Figura 19A). Na presença do complexo RuApy os espectros de CD inicialmente mostraram a ausência de qualquer estrutura organizada da proteína, e após o protocolo de agregação de 24 horas, foi observada um aumento na absorção mínima em 200 nm, sugerindo a formação de conformações aleatoriamente estruturadas (Figura 19B).

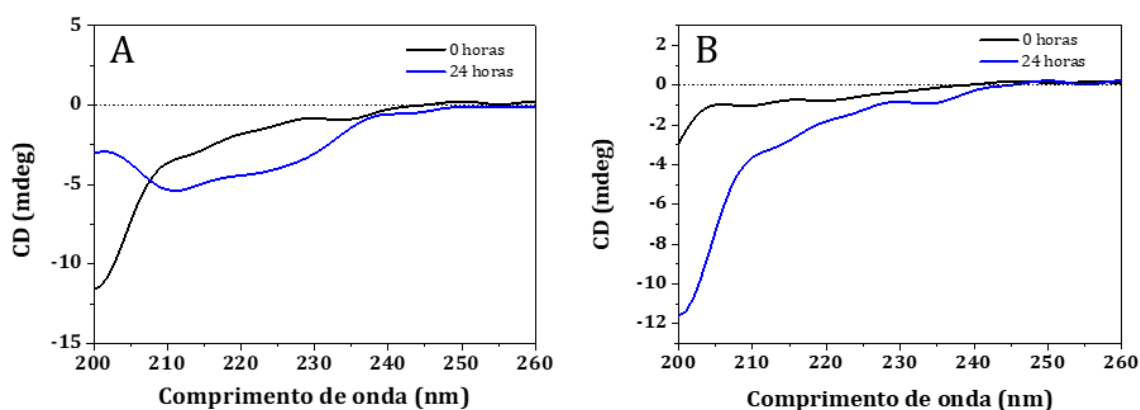


FIGURA 19. Espectros de dicroísmo circular obtidos para a agregação cruzada entre (A) $A\beta$ /Insulina e (B) $A\beta$ /Insulina/RuApy nos tempos 0h (preto) e 24h (azul).

2.4.4.3. Microscopia de Força Atômica

Com o auxílio da AFM foi possível monitorar as estruturas formadas para a agregação do peptídeo $A\beta$ na ausência e na presença de insulina e do complexo RuApy. As imagens obtidas para o tempo zero,

dispostas na Figura 20, mostram para todas as condições a presença de espécies oligoméricas e pequenos agregados pré-formados em maior ou menor quantidade.

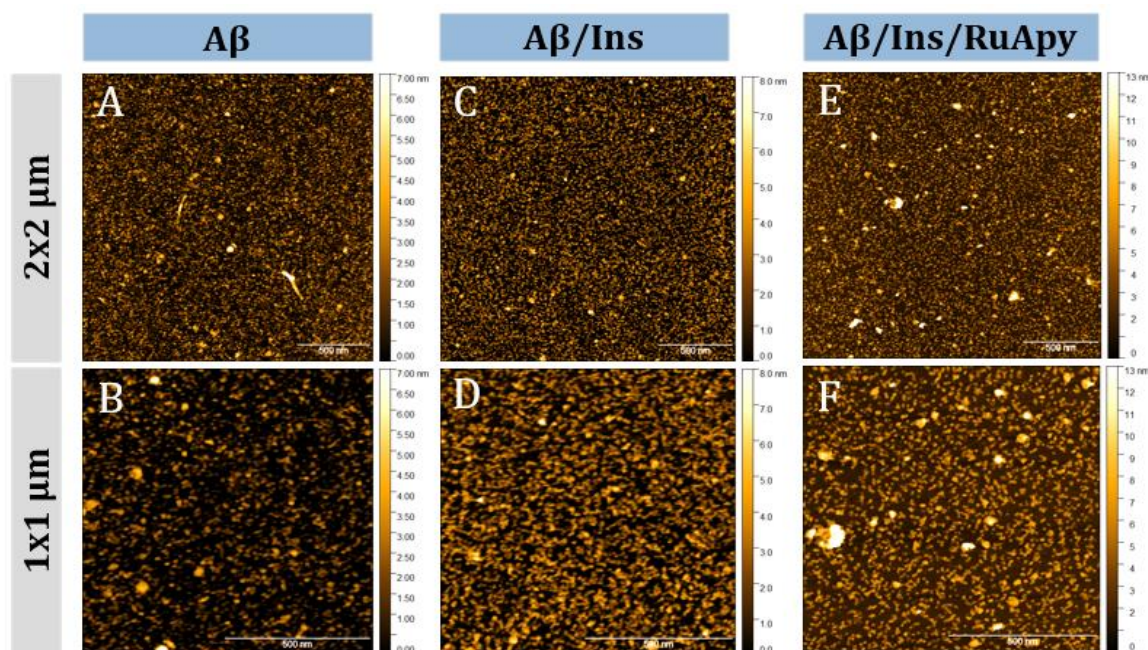


FIGURA 20. Imagens de microscopia de força atômica obtidas no tempo 0h para a agregação (A) e (B) do peptídeo A β ; (C) e (D) A β /Insulina; (E) e (F) A β /Insulina/RuApy. As imagens (A); (C) e (E) possuem varredura de 2x2 μ m e as imagens (B); (D) e (F) possuem varredura de 1x1 μ m.

Entretanto, a diferença é notável após 24 horas de agregação. Ao passo que são observadas estruturas fibrilares bem definidas para o peptídeo A β , a insulina leva à formação de agregados amorfos e estruturas sem forma definida, corroborando os ensaios de luminescência e dicroísmo circular (Figura 21). Já o complexo não apresenta nenhuma das duas estruturas fibrilares, ao invés disso são observadas pequenos aglomerados sem nenhum tipo de organização definida.

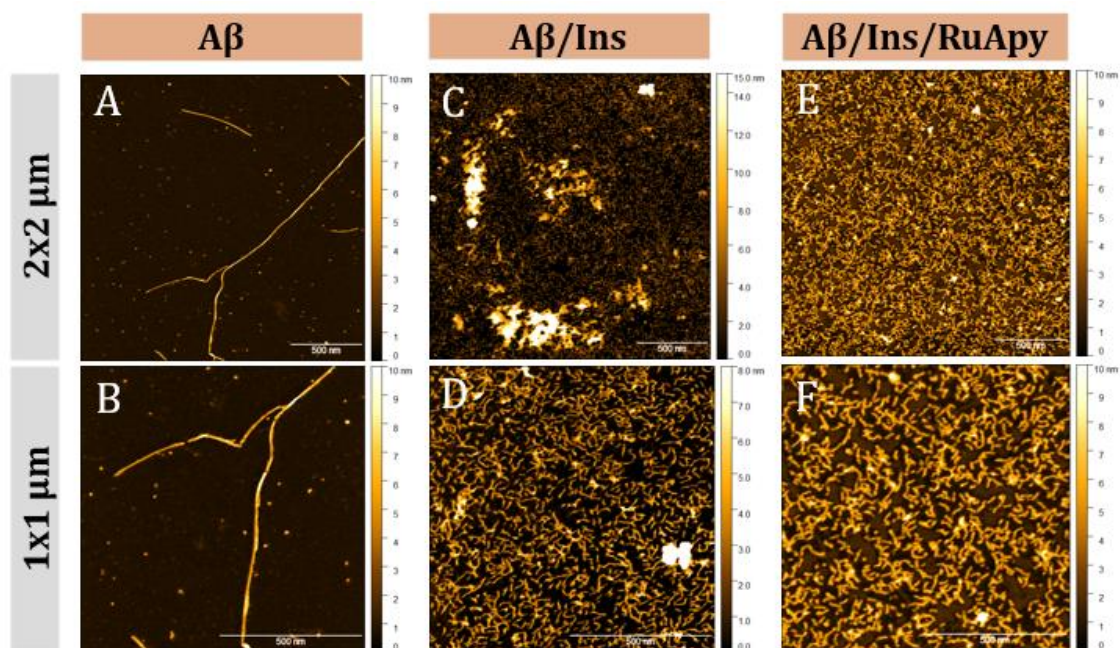


FIGURA 21. Imagens de microscopia de força atômica obtidas no tempo 24h para a agregação (A) e (B) do peptídeo A β ; (C) e (D) A β /Insulina; (E) e (F) A β /Insulina/RuApy. As imagens (A); (C) e (E) possuem varredura de 2x2 μ m e as imagens (B); (D) e (F) possuem varredura 1x1 μ m

2.4.5. Microscopia de Imagem por Tempo de vida de Fluorescência (FLIM)

Os efeitos do complexo RuApy no "cross-seeding" entre o peptídeo A β e Insulina Humana sugerem que o complexo interfere no mecanismo de agregação cruzada, impedindo a formação de grandes agregados tóxicos e interrompendo a progressão das interações que levam à formação de estruturas ricas em ligações de hidrogênio. Imagens TCSPC-FLIM foram adquiridas para avaliar as mudanças no decaimento do estado excitado do complexo RuApy na presença dessas estruturas (Figura 22).

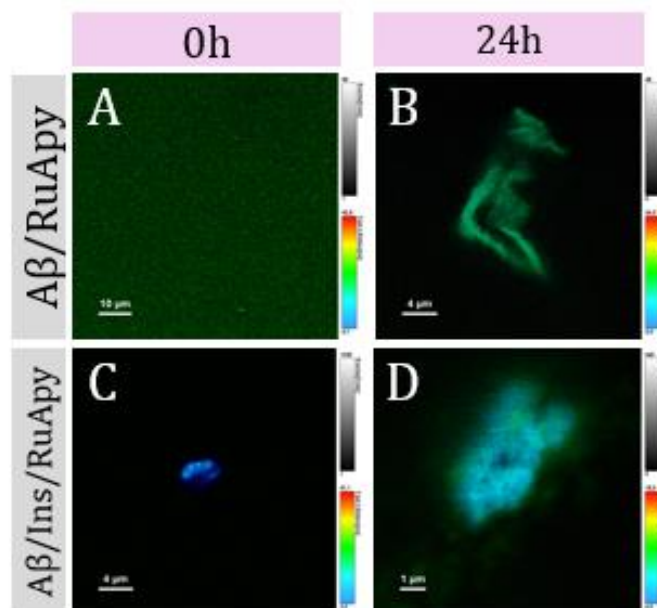


FIGURA 22. Imagens de FLIM para os tempos 0h e 24h de agregação do (A,B) peptídeo A β /RuApy e (C,D) A β /Insulina/RuApy.

Inicialmente, os 3 tempos de vida observados para a interação do complexo RuApy com o peptídeo A β em solução foram de $\sim 37 \pm 0.9$ ns, 3.2 ± 0.3 ns e 0.49 ± 0.02 ns, com ajuste tri-exponencial. Em tempos iniciais não foram observados grandes agregados e por isso a imagem foi tomada pela forte emissão do complexo na região de leitura (600 nm). Após as 24 horas de incubação na presença do complexo, o peptídeo A β apresentou estruturas fibrilares com 2 tempos de vida na ordem de 10 ± 0.4 e 1.23 ± 0.04 ns.

A junção da insulina humana ao sistema apresentou, em tempos iniciais, também três tempos de vida com ajuste tri-exponencial. Após 24 horas, nas periferias das estruturas formadas, foi registrado um tempo de vida de 19.0 ± 0.57 ns, enquanto no centro, um tempo de vida de 1.90 ± 0.073 ns foi observado. Os tempos de vida obtidos para os ensaios de FLIM estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de tempo de vida de emissão obtidos por microscopia de fluorescência resolvida no tempo (FLIM) para as combinações A β /RuApy e A β /Ins/RuApy nos tempos 0h e 24h.

| | Condição | τ_1 (ns) | τ_2 (ns) | τ_3 (ns) | χ^2 |
|----------|----------------------|------------------|-----------------|------------------|----------|
| 0 horas | A β /RuApy | 37,00 \pm 0,92 | 3,20 \pm 0,30 | 0,498 \pm 0,02 | 1,043 |
| | A β /Ins/RuApy | 8,8 \pm 0,54 | 2,20 \pm 0,11 | 0,52 \pm 0,02 | 1,063 |
| 24 horas | A β /RuApy | 10,00 \pm 0,47 | 1,23 \pm 0,04 | -- | 1,031 |
| | A β /Ins/RuApy | 19,00 \pm 0,57 | 1,90 \pm 0,07 | -- | 0,096 |

O tempo de vida de 19.0 ns indica interação entre o complexo RuApy e a superfície das estruturas formadas. O complexo RuApy atua modulando a agregação dessas proteínas e impedindo o empilhamento de pequenas estruturas, interrompendo a fase de alongamento e a formação de agregados fibrilares, como visto nas imagens de AFM.

2.4.6. Viabilidade Celular

As observações feitas nas seções anteriores sugerem que a insulina e o complexo RuApy exercem efeito modulador na agregação do peptídeo A β . De modo a investigar a toxicidade dos agregados formados, células de neuroblastoma SH-SY5Y foram incubadas por 24 e 48 horas com diversas condições envolvendo a agregação cruzada entre as duas proteínas e o complexo de Ru(II) como apresentados na Figura 23.

Em soluções recém preparadas do peptídeo A β , os experimentos anteriores mostraram a presença de espécies oligoméricas em grande quantidade. Coincidentemente, o ensaio de MTT revelou que os maiores danos celulares foram causados pelas espécies iniciais da agregação do A β , reduzindo a viabilidade celular em 40%. Efeitos pronunciados foram

observados após 48 horas de incubação, podendo indicar morte por apoptose.

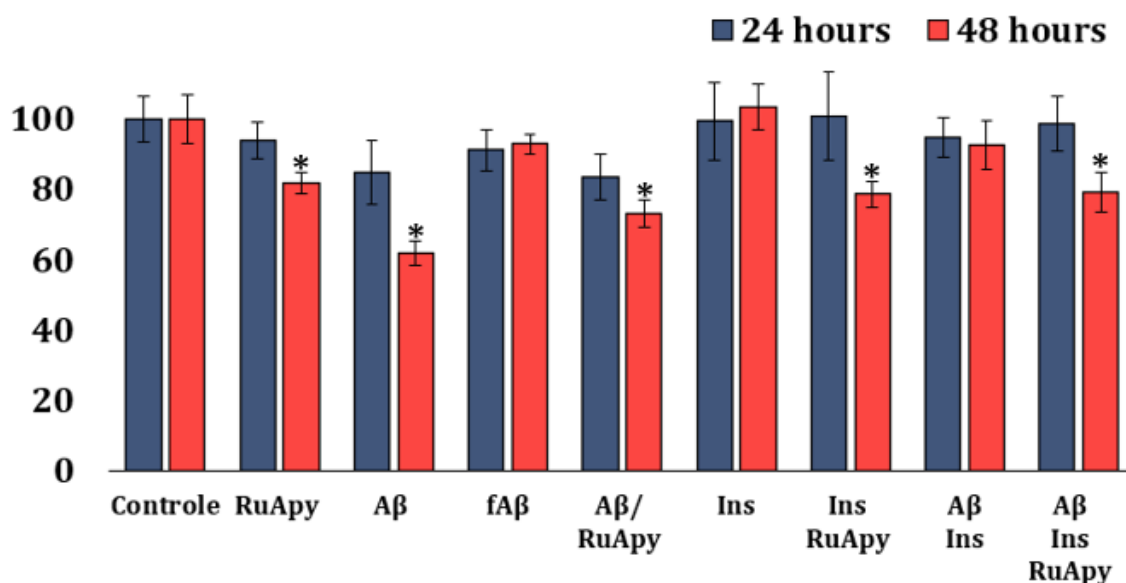


FIGURA 23. Valores de viabilidade celular das células de neuroblastoma SH-SY5Y na presença do complexo RuApy ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$); do peptídeo A β e sua espécie fibrilar (fA β); E do peptídeo A β na presença de Insulina e Insulina/RuApy. *($p < 0,05$)

Em contraposição, nenhum efeito citotóxico foi observado para incubação com fibrilas já formadas (fA β). É interessante lembrar que a hipótese do oligômero propõe que estes são os responsáveis pelos danos neuronais causados no desenvolvimento da DA e não os depósitos fibrilares, assim como observado aqui.

A insulina de fato parece desempenhar um papel neuromodulador protegendo as células SH-SY5Y da citotoxicidade das espécies iniciais do peptídeo A β . Já o complexo RuApy, que também desempenha papel modulador na agregação dessas proteínas, apresenta a mesma redução de 20% na viabilidade celular da SH-SY5Y nas condições em que aparece. Essa observação nos leva a pensar que os agregados formados

na agregação cruzada não são tóxicos, embora o próprio complexo apresente citotoxicidade significativa.

Estudos recentes demonstraram que os monômeros de insulina interagem diretamente com A β retardando sua fibrilação e aliviando os danos citotóxicos causados pelas espécies oligoméricas, preservando a viabilidade celular de células SH-SY5Y. Em geral, a agregação cruzada entre ambas as proteínas desloca o equilíbrio para a formação de espécies solúveis e não-tóxicas do A β .^{148,149} Nesse sentido, Long et al. (2016) demonstrou que a insulina atrasa a fase de nucleação do peptídeo A β , além de proteger contra a ruptura induzida por oligômeros de A β em modelos de membranas celulares.¹⁵⁰ De forma complementar, Du et al. (2018) destacaram que a quiralidade de superfície (L-Phe e D-Phe) influencia diretamente na morfologia dos agregados formados. Superfícies de D-Phe promovem a fibrilação da insulina e levam a perda de bioatividade, enquanto superfícies L-Phe favorecem a formação de agregados amorfos, que não se mostraram tóxicos para células de feocromocitoma PC12.¹⁵¹

Em suma, essas observações sugerem que a insulina consegue atenuar os danos citotóxicos causados pelo peptídeo A β , embora os mecanismos de ação de uma proteína sobre a outra ainda não sejam completamente esclarecidos. O entendimento sobre essas interações pode oferecer novas perspectivas para compreender a resistência à insulina no contexto da doença de Alzheimer.

Neste trabalho demonstramos que a insulina humana leva à formação de agregados amorfos não-tóxicos do peptídeo A β_{42} e que essa interação pode ocorrer via N-terminal, uma vez que a presença de insulina suprimiu a formação de íons tirosinato. O complexo RuApy, que

mostrou a mesma supressão nos ensaios de luminescência intrínseca, impede a formação de grandes agregados híbridos ($A\beta_{42}$ /Insulina).

2.5. Conclusões parciais

Com base nas observações feitas neste capítulo, conclui-se que tanto o complexo RuApy quanto a Insulina Humana competem com as interações interpeptídicas, ligando-se ao peptídeo $A\beta$ durante os estágios iniciais de agregação e desviando o caminho tóxico de formação de fibrilas maduras para a formação de agregados amorfos.

Os ensaios de luminescência mostraram a formação de íons tirosinato para o peptídeo $A\beta$, com concomitante formação de agregados fibrilares ricos em folhas- β , como visto nos espectros de dicroísmo circular e nas imagens de AFM. Entretanto, a presença de insulina no sistema leva à supressão na formação de íons tirosinato e à formação de agregados amorfos, que não se mostraram tóxicos para células SH-SY5Y. Podemos concluir que a insulina interage com o N-terminal do peptídeo $A\beta$, impedindo a propagação da rede de ligações de hidrogênio e a formação de fibrilas maduras.

A agregação cruzada $A\beta$ /Insulina na presença do complexo RuApy demonstrou comportamentos parecidos, supressão na formação de íons tirosinato e a formação de pequenos agregados sem forma definida. As imagens de FLIM mostraram que o complexo RuApy atua na superfície das espécies iniciais formadas na interação cruzada $A\beta$ /Insulina. Conclui-se, por fim, que o complexo RuApy atua na fase de nucleação da

agregação cruzada, impedindo o empilhamento das espécies iniciais e a formação de grandes agregados.

3.

As influências do complexo *cis*- [Ru(phen)₂(pNDIp)]²⁺ na agregação do peptídeo Aβ *in vitro* e *in vivo*

“Eu sou apenas um rapaz latino-americano, sem dinheiro no banco, sem parentes importantes e vindo do interior.”

- Belchior

3.1. Contextualização

3.1.1. Modelos animais para a doença de Alzheimer

O uso de animais transgênicos para o estudo de doenças neurodegenerativas pode fornecer informações preciosas sobre a etiologia e progressão dessas doenças, além de permitir o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Camundongos que possuem diferentes genes associados à doença de Alzheimer apresentam deposição amiloide na forma de placas senis e angiopatia cerebral amiloide. As modificações genéticas envolvem mutações nos genes da APP, da ApoE e das PS1 e PS2.¹⁵²

Destaque deste capítulo, os camundongos APP/PS1 possuem os genes mutantes APP^{swe} e PS1^{dE9}. Isto é, esses animais foram injetados nos núcleos das células embrionárias dos animais foram injetados DNA transgênico: o transgene quimérico (Mouse/Human) APP695 contendo a mutação sueca K594M/N595L associada à produção do peptídeo A β e o gene PS1 com deleção do éxon 9, também relacionada ao desenvolvimento da doença de Alzheimer. Os camundongos transgênicos APP/PS1 possuem deposição precoce do A β no córtex e hipocampo, regiões associadas à memória e cognição, com início aos 4 meses de idade.¹⁵²⁻¹⁵⁴ O modelo em questão se aproxima da patologia encontrada em casos de DA familiar ou genética, e não representam casos esporádicos ou de desenvolvimento tardio, que representa quase 90% dos casos de DA no mundo.

Nos últimos anos, os avanços nas técnicas de neuroimagem foram significativos, e sua adaptação para modelos animais tem proporcionado dados com alta resolução temporal e sensibilidade. O surgimento da microscopia de multifótons melhorou significativamente o estudo crônico de doenças neurodegenerativas *in vivo*, além de ser uma alternativa ao acompanhamento feito com radioisótopos.¹⁵⁵

3.1.2. Microscopia Multifotônica

A microscopia de excitação por dois ou mais fótons é uma técnica de imagem minimamente invasiva ideal para estudar tecidos vivos com resolução subcelular e para realizar imagens tridimensionais, com profundidades que podem chegar a milímetros. Ao contrário da microscopia de fluorescência convencional, onde a luz de excitação tem menor comprimento de onda que a luz emitida pela amostra, a excitação multifotônica ocorre quando dois ou três fótons, com comprimento de onda maior que a luz emitida, são absorvidos simultaneamente.¹⁵⁶

A absorção multifotônica é baseada na ideia de que dois ou mais fótons de baixa energia podem excitar um fluoróforo em um evento quântico, porém com probabilidade muito baixa, sendo necessário um alto fluxo de fótons, geralmente por um laser pulsado na ordem de femtossegundo. A alta incidência de fótons de baixa energia geram um estado virtual, que nada mais é do que uma flutuação quântica temporária, com tempo de vida muito curto. O mecanismo dois fótons só ocorre se o segundo fóton for absorvido nesse curto espaço de tempo.¹⁵⁷

A vantagem da MMF é justamente o uso de luz infravermelha próxima, que minimiza a dispersão no tecido e evita a absorção de biomoléculas, reduzindo o sinal de fundo e permitindo maior profundidade. Além disso, o uso de luzes de baixa energia (altos comprimentos de onda) causam menos dano à células e não promovem fotobranqueamento.¹⁵⁸ O mecanismo de absorção de dois fótons está ilustrado na Figura 24.

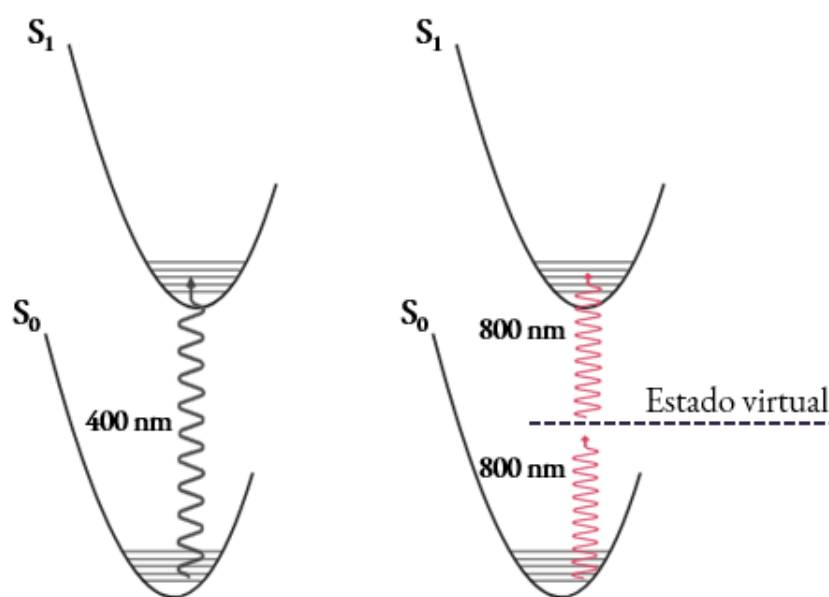


FIGURA 24. Esquema simplificado do mecanismo de absorção de um e dois fótons.

3.2. Objetivos do capítulo

- Sintetizar e caracterizar o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(pNDIp)₂](PF₆)₂ utilizando as técnicas de espectroscopia de RMN (¹H e ¹³C) e espectroscopia de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS);
- Caracterizar o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(pNDIp)₂](PF₆)₂ utilizando técnicas espectroscópicas de absorção eletrônica na região do UV-Vis e de luminescência no estado estacionário;

- Avaliar a influência do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(pNDIp)₂](PF₆)₂ na agregação do peptídeo Aβ₄₂ *in vitro* utilizando técnicas de luminescência no estado estacionário, dicroísmo circular, nefelometria e microscopia eletrônica de transmissão (TEM);
- Observar os efeitos do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(pNDIp)₂](PF₆)₂ na progressão e desenvolvimento da doença de Alzheimer em modelos de camundongos transgênicos APP^{swe}/PSEN1^{dE9}, em tempo real, utilizando microscopia por excitação de dois fótons;
- Avaliar os impactos do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(pNDIp)₂](PF₆)₂ na deposição amiloide em camundongos transgênicos APP^{swe}/PSEN1^{dE9} por meio de análises post-mortem, como ELISA e imunofluorescência em amostras de tecido cerebral.

3.3. Materiais e Métodos

3.3.1. Reagentes

São de procedência Sigma-Aldrich todos os reagentes utilizados para a síntese do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(pNDIp)](PF₆)₂ - RuCl₃.H₂O; 1,10-fenantrolina (phen); Cloreto de Lítio (LiCl); naftaleno-1,4,5,8-tetracarboxílico dianidrido, fenantrolina-5-amino, trietilamina e hexafluorofosfato de amônio (NH₄PF₆). São de procedência Synth todos os sais envolvidos na preparação do tampão fosfato salino (PBS) - Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄); Fosfato de potássio bibásico (K₂HPO₄); Cloreto de sódio (NaCl) e Cloreto de potássio (KCl). Os solventes orgânicos possuem grau de pureza HPLC e as soluções aquosas deste trabalho foram feitas utilizando água MilliQ.

3.3.2. Síntese do complexo cis-[Ru(phen)₂Cl₂]

O complexo precursor [Ru(phen)₂Cl₂] foi sintetizado em 15 mL de DMF previamente destilado e desaerado. Para a síntese, os seguintes reagentes foram adicionados na seguinte ordem:

(1) 200 mg de RuCl₃·H₂O (0,76 mmol);

(2) 1,10-fenantrolina em excesso de 2x + 10% (289,5 mg - 1,60 mmol);

(3) 230 mg de LiCl (5,40 mmol).

A reação foi conduzida sob refluxo e agitação constante por 8 horas, em atmosfera de N₂ e ausência de luz. Após esse período, o produto da reação foi filtrado em funil de sílica. O sólido preto obtido foi lavado com água gelada até que a água de lavagem ficasse incolor, seguido de lavagem com acetona gelada e secagem à vácuo. O rendimento médio da síntese foi de 60%.

3.3.3. Síntese do ligante N,N'-bis-1,10-fenantrolina-1,4,5,8-naftalenotetracarboxílico diimida (pNDIp)

O ligante pNDIp foi sintetizado conforme procedimentos da literatura com algumas modificações,¹⁵⁹ o esquema da síntese está apresentado na Figura 25. Assim, em 3 mL de DMF previamente destilado e desaerado foi adicionado:

(1) 100 mg (0,37 mmol) de naftaleno-1,4,5,8-tetracarboxílico dianidrido;

O sistema foi selado e a temperatura foi ajustada a 130 °C em banho de silicone. Ao atingir a temperatura, adicionou-se gota a gota com o auxílio de uma seringa:

(2) 225 mg de fenantrolina-5-amino (1,15 mmol) dissolvida em 3 mL de DMF (aqui a síntese deve passar de uma suspensão marrom-claro para uma solução marrom escuro);

(3) 215 µL de trietilamina (1,53 mmol).

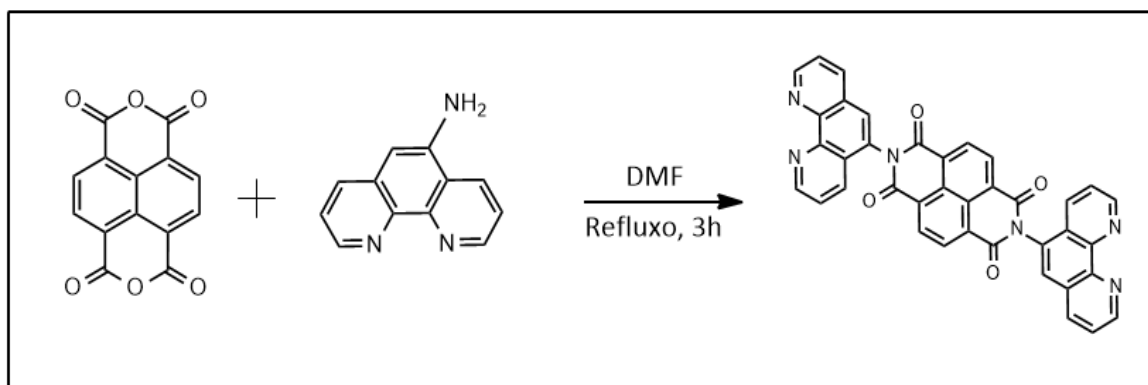


FIGURA 25. Esquema de rota sintética para a produção do ligante pNDIp.

A reação foi conduzida sob refluxo e agitação constante por 3 horas em atmosfera de N₂. Após 3 horas de reação o sistema foi retirado do banho de silicone e deixado em repouso até atingir temperatura ambiente (aqui observa-se a precipitação de um sólido). O produto foi filtrado em filtro de sílica, lavado com 10 mL de etanol gelado e seco a vácuo.

Por fim, o sólido amarelo pálido foi lavado com DMF quente (50 mL), para retirar o naftaleno precursor que não reagiu e com 50 mL de

etanol gelado, para retirar resquícios de fenantrolina-5-amino e DMF. O sólido foi seco a vácuo e o rendimento médio da síntese foi de 50%.

3.3.4. Síntese do complexo *cis*- [Ru(phen)₂(pNDIp)](PF₆)₂ (RuNDI)

A rota de síntese do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(pNDIp)](PF₆)₂ está representada na Figura 26. A reação foi realizada em 15 mL de DMF previamente destilado e desaerado. Ao meio reacional adicionou-se:

- (1) 100 mg (0,18 mmol) do precursor *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂];
- (2) 170 mg (0,25 mmol) do ligante pNDIp.

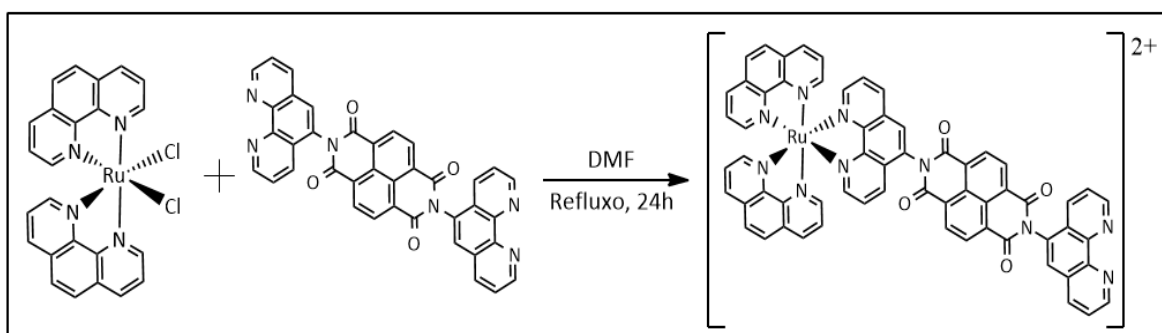


FIGURA 26. Esquema de rota sintética para a produção do complexo RuNDI

A reação foi conduzida sob refluxo e agitação constante por 24 horas (ao longo do tempo a reação passa de preto para vermelho), em atmosfera de N₂ e na ausência de luz. Passado o período de síntese, a mistura reacional foi filtrada, ainda quente, em algodão (para retirar o excesso de ligante insolúvel) e ao filtrado foi adicionado 62 mg (0,37 mmol) de NH₄PF₆. O produto foi precipitado com 250 mL de éter e deixado sob refrigeração por uma noite.

Por fim, o sólido vermelho foi filtrado em filtro de sílica e solubilizado em 50 mL de acetona. As soluções de coloração laranja foram centrifugadas à 12.000 RPM por 10 minutos (aqui nota-se o acúmulo de precipitado no fundo dos tubos de centrifugação), para retirada do excesso de ligante pNDIp. O sobrenadante foi rotaevaporado e o sólido obtido novamente solubilizado em acetona, processo realizado até que nenhum resquício de precipitado seja observado no fundo dos tubos de centrifugação ou nas paredes dos balões utilizados no processo de secagem. O sólido vermelho escuro foi isolado por rotaevaporação e seco a vácuo. O rendimento médio da síntese foi de 60%.

3.3.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos no espectrômetro BRUKER DXR 400 MHz do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. Para isso, solubilizou-se 3 mg dos produtos obtidos nos itens 3.3.3. e 3.3.4. em 600 μL de DMSO- d_6 .

3.3.6. Espectroscopia de Absorção no UV-Visível

Os espectros de absorção eletrônica na região do UV-vis foram obtidos através de um espectrofotômetro Agilent 8453A. Para tal, foram utilizadas celas de quartzo de caminho ótico 10 mm e volume 3.5 mL.

3.3.7. Espectroscopia de Luminescência no estado estacionário

Os espectros de emissão foram obtidos no espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC com lâmpada de xenônio de alta pressão (150 W) e fotomultiplicadora do tipo R928. Para os experimentos de caracterização do complexo foram utilizadas celas de quartzo de quatro lados de caminho ótico 10 mm e volume 3.5 mL.

3.3.8. Preparo do Peptídeo A β ₄₂

Os ensaios de CD, nefelometria e TEM foram realizados pela Dr.^a Mariana Pigozzi Cali. Para isso, o peptídeo A β ₄₂ liofilizado foi dissolvido em guanidina-HCl 6M e incubado por 3 horas a fim de dissolver quaisquer agregados pré-formados. O peptídeo foi purificado por cromatografia de exclusão de tamanho utilizando uma coluna preparativa (Cytiva Superdex 200 Increase 10/300 GL) e eluído em tampão NaPi (fosfato de sódio 20 mM, EDTA 0.2 mM, pH 8). A concentração de proteína foi aferida usando o detector de UV do Sistema ÄKTA utilizado na purificação, usando a média integrada do pico da proteína eluída (concentração = média da área do pico/0,2*1490).

3.3.9. Nefelometria

Soluções recém-preparadas de A β ₄₂ foram incubadas por 30 minutos à baixas temperaturas, com diferentes proporções do complexo RuNDI, (1:1); (1:2) e (1:5). Após o período de pré-incubação, as

amostras foram colocadas em placas de 96 poços de meia-área (Corning 3881) e levadas ao nefelômetro (NEPHELOstar Plus, BGM) à 37 °C por 4 horas.

3.3.10. Dicroísmo Circular

Amostras do peptídeo A β ₄₂ recém preparadas foram incubadas na presença do complexo RuNDI nas proporções (1:1) e (1:5) à 37 °C por 24 horas em uma incubadora estática (HeraTherm Incubator, Thermo Fischer). As amostras foram centrifugadas a 21000 rfc à 4 °C por 90 minutos. O precipitado foi suspenso em água deionizada e levadas ao espectropolarímetro Jasco-815 em uma cela despolarizada de caminho ótico 1 mm. Os espectros de dicroísmo circular e as medidas de nefelometria foram coletadas pela Dr.^a Mariana Pigozzi Cali.

3.3.11. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Soluções frescas do peptídeo A β ₄₂ foram incubadas com o complexo RuNDI (1:5) à baixas temperaturas por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 21000 rfc à 4 °C por 30 minutos e o precipitado obtido foi suspenso em água deionizada e depositadas em grades de cobre recobertas com filme de carbono 400 mesh 3m. Após uma lavagem com água deionizada, as amostras foram incubadas com acetato de uranila 1 % (m/v) por 2 minutos. Por fim, foram lavadas duas vezes com água deionizada e deixadas secar ao ar. As imagens foram obtidas em um microscópio eletrônico TALOS F200X G2, pertencente ao Cambridge Advanced Imaging Center pela Dr.^a Heather Greer.

3.3.12. Animais e Tratamento

Os ensaios *in vivo* e *ex vivo* apresentados neste capítulo foram realizados em parceria com a Prof.^a Dr.^a Mònica Garcia-Alloza da Universidad de Cádiz na Espanha, durante o período de doutorado sanduíche do autor. Para isso, camundongos WT (controle, tipo selvagem, C57BL/6) e APP/PS1 (APP^{swe}/PSEN1^{dE9}, linhagem C57BL/6) foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: (1) WT-controle (n = 4); (2) WT-RuNDI (n = 4); (3) APP/PS1-controle (n = 4); (4) APP/PS1-RuNDI (n = 4).

Durante as primeiras 20 semanas de idade os animais foram mantidos em convívio com seus pares em jaulas separadas por sexo e genótipo. Os camundongos foram mantidos em ciclo de luz/escuro de 12h, com comida e água a vontade.

Às 20 semanas de idade, os animais passaram a receber um tratamento diário do complexo RuNDI até que atingissem 30 semanas de idade. Os grupos (2) e (4) foram tratados diariamente com o complexo RuNDI (PBS, 1 mg/kg/dia), enquanto os grupos controle (1) e (3) receberam apenas PBS como tratamento (veículo da solução de RuNDI). O tratamento foi administrado via intraperitoneal (IP).

Concomitante ao início do tratamento, os camundongos foram submetidos a um processo cirúrgico para implantação da janela craniana e realizada a primeira sessão de imagens por microscopia multifotônica. Aqui foram estabelecidas as zonas cerebrais que seriam acompanhadas a cada duas semanas durante todo o período de tratamento, ou seja, até as 30 semanas de idade. O período de cada etapa está ilustrado na Figura 27.

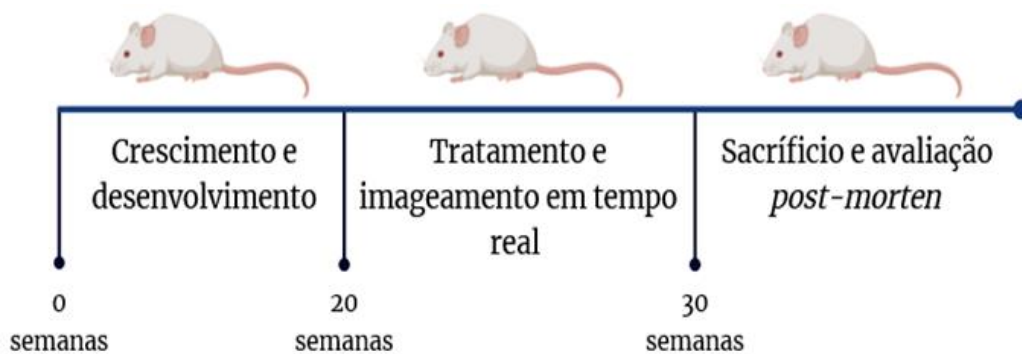


FIGURA 27. Linha do tempo para os experimentos envolvendo camundongos transgênicos APP/PS1 dividida em: Crescimento e Desenvolvimento; Tratamento e Imageamento em tempo real e Sacrifício e Análises post-mortem.

Quando atingiram 30 semanas de idade, os camundongos foram anestesiados com uma sobredose de hidrato de cloral (70 mg/mL) e sacrificados por decapitação. Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca e armazenadas em tubos contendo 50 μ L de heparina monossódica para evitar coagulação. Posteriormente as amostras foram centrifugadas para obtenção do plasma.

Os cérebros dos animais foram coletados e pesados. O hemisfério esquerdo foi dissecado em partes representativas do cérebro como córtex visual, córtex somatossensorial, hipocampo e cerebelo e o hemisfério direito foi fixado em paraformaldeído 4% (PFA). Tanto o plasma, quanto o tecido fresco foram armazenados à -80 °C e o hemisfério esquerdo foi armazenado em PFA à 4 °C.

Todos os procedimentos seguiram as normas de Uso e Cuidados de Animais da Universidade de Cádiz em acordo com as Diretrizes para Cuidados de Uso de Animais Experimentais (Diretiva da Comissão Europeia 2010/63/EU e Real Decreto Espanhol 53/2013).

3.3.13. Janela Craniana

A janela craniana permite o acompanhamento em tempo real de vasos sanguíneos e placas amiloides utilizando um microscópio multifótons. Para isso, o crânio dos camundongos APP/PS1 foi cortado entre as regiões do bregma e lambda, com um diâmetro aproximado de 6 mm, utilizando uma broca giratória. Esses dois pontos são encontros das suturas do crânio e são comumente utilizadas para localizar estruturas específicas do cérebro, como o hipocampo ou o córtex motor; neste caso o corte foi feito para expor o córtex somatossensorial.

Em seguida, foi colocado um cristal circular coberto com PBS e fixado com cimento odontológico. Uma placa impressa em 3D foi acoplada ao cristal, garantindo a fixação do crânio durante as seções de imagem, como ilustrado na Figura 28. O procedimento conta com as seguintes etapas: 1) Fixação e limpeza da área; 2) Remoção dos pelos locais; 3) Exposição do crânio; 4) Corte e remoção do crânio; 5) Implantação da janela craniana; 6) Fixação da janela craniana para as seções de imageamento. Durante todo o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos sedados em uma atmosfera com 5% de O₂ e 2% de Isoflurano, além de receberem lubrificante ocular para prevenir olhos ressecados.

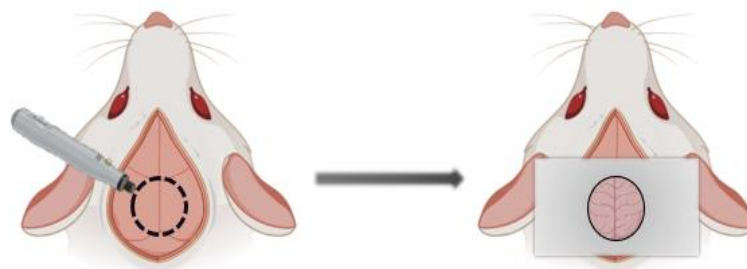


FIGURA 28. Processo de implantação da janela craniana em camundongos transgênicos APP/PS1 para o seguimento de placas amiloides em tempo real.

3.3.14. Microscopia Multifotônica

Preparo dos animais: As sessões de imageamento por microscopia multifotônica por excitação de dois fótons foram realizadas a cada duas semanas a partir da 20^a semana de idade dos camundongos (20, 22, 24, 26, 28 e 30 semanas). Para visualização de placas amiloide os animais APP/PS1 foram injetados intraperitoneal com uma solução de Methoxy-XO4 (4 mg/kg) 24 horas antes da sessão de imagens. Para localização das distintas zonas cerebrais os angiogramas foram realizados utilizando 100 µL de Texas Red dextran 70 kDa (12.5 mg/mL) injetados de forma retrorbital momentos antes das sessões de imagem. Os animais foram mantidos sob anestesia inalatória de 2% isoflurano e 5% O₂, com manta térmica à 37 °C para evitar hipotermia e lubrificante ocular para prevenir olhos ressecados.

Sessões de imagem: As imagens foram adquiridas utilizando em um sistema de varredura a laser multifotônico Fluoroview FV1000 MPE acoplado em um microscópio Olympus Bx61WI. O mecanismo de dois fótons foi gerado por um laser de modo bloqueado Deep-See Mai Tai Ti:Safira (Mai Tai; Spectra-physics) com excitação em 800 nm e a emissão resultante foi coletada em três fotomultiplicadores (Hamamatsu) distintos: 380-480 nm (azul), 500-540 nm (verde) e 560-650 nm (vermelho). Depósitos amiloides foram visualizados em campos de 512x512 µm, com 40 saltos de 5 µm no eixo Z, num total de 200 µm de profundidade. As imagens foram tratadas e analisadas com o software de acesso livre ImageJ.

3.3.15. ELISA para níveis de A β ₄₀ e A β ₄₂ solúveis e insolúveis

Preparo das amostras: Níveis de A β ₄₀ e A β ₄₂ **solúveis** foram obtidos para amostras de plasma sanguíneo e de córtex somatossensorial. Para tal, alíquotas de sangue foram centrifugadas (12.000 RPM, 10 min, 4°C) e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C até o uso. Já o tecido cortical foi homogeneizado em 50 μ L de Pierce™ IP Lysis Buffer (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Espanha), suplementado com o coquetel de inibidores Halt™ de protease e fosfatase (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Espanha). As amostras foram então centrifugadas, e o sobrenadante foi coletado.

O precipitado obtido no processamento das amostras de córtex somatossensorial foi utilizado para aferir os níveis de A β ₄₀ e A β ₄₂ **insolúveis**. Assim, o pellet foi ressuspenso em 50 μ L de ácido fórmico 70% e após 10 minutos as amostras foram centrifugadas a 14.500 RPM por 12 min a 4 °C. Por fim, foram neutralizadas com tampão Tris (pH 11) em proporção 1:50. Resultados foram obtidos para os quatro grupos representativos: (1) WT-controle (n = 4); (2) WT-RuNDI (n = 4); (3) APP/PS1-controle (n = 4); (4) APP/PS1-RuNDI (n = 4).

Montagem das placas: O ensaio de ELISA foi realizado com a incubação de 100 μ L de cada tipo de amostra (plasma, córtex solúvel e córtex insolúvel) em uma placa de 96 poços, previamente tratada com anticorpos de detecção específicos para captura de antígenos, durante uma noite a 4 °C, em ausência de luz. Após a incubação, os poços foram lavados cinco vezes com tampão de lavagem para remover o excesso de

proteína não ligada ao anticorpo. Em seguida, foram adicionados 100 µL de anticorpo conjugado com peroxidase de rábano, e a placa foi incubada por 1 hora sob refrigeração. Após esse período, os poços foram novamente lavados cinco vezes e 100 µL de tetrametilbenzidina (TMB) foram adicionados, sendo incubado por 30 minutos à temperatura ambiente e em ausência de luz. Por fim, foram adicionados 100 µL de uma solução de parada (H₂SO₄ 0,2 mol/L), e a absorbância foi medida a 450 nm. Para a construção das curvas padrão, foram utilizados os peptídeos humanos Aβ40 e Aβ42 fornecidos pelo kit (PAG200910 Antibody (bnt977) - coated microtiter plate. 297-62611).

3.3.16. Imunofluorescência de placas amiloides – 4G8 e ThS

Obtenção das amostras: O hemisfério esquerdo foi fixado em paraformaldeído 4% por duas semanas e, em seguida, imerso em uma solução contendo 30% de sucrose e 0,02% de azida de sódio. Após a saturação do tecido com sucrose, realizou-se a crioproteção utilizando Tissue-Tek® O.C.T (Sakura Finetek). O tecido foi cortado em seções de 30 µm no plano coronal a -25 °C, utilizando um criostato (Micrótomo Criostato HM525, Thermo Fisher Scientific) e armazenadas a 4 °C em solução de PBS/glicerol (1:1) até o uso. Para o ensaio de imunofluorescência foram selecionadas 6 diferentes seções localizadas a 1 mm de distância umas das outras (de 1,5 a -3,5 mm a partir do bregma). As seções selecionadas são representativas para córtex (n = 6) e hipocampo (n = 3).

Preparo das amostras: As seções foram lavadas com ácido fórmico 70% durante 10 minutos e bloqueadas por 1h em 3% BSA e 0,5% Triton-X100. Depois disso, foram incubadas em solução de 4G8 goat anti-mouse (Biolegend, London)(1:1000) e 0,5% BSA à 4°C por uma noite, seguidas do anticorpo secundário conjugado à Alexa Fluor 594 goat anti-mouse (Molecular Probes, USA) por 2h em ausência de luz. Por fim, as seções foram incubadas com ThS 0,05% por 10 minutos e montadas em lâminas de adesão Thermo Scientific™ SuperFrost Plus™. As imagens foram adquiridas com um microscópio de fluorescência Laser Olympus U-RFL-T (Olympus, Tokyo, Japan) e o software MMICellTools (4G8 (λ_{ex} : 540nm; λ_{em} : 575nm), ThS (λ_{ex} : 495nm; λ_{em} : 519nm)). O software ImageJ foi utilizado para tratamento das imagens e obtenção de parâmetros como número e tamanho de placas (μm^2); densidade (placas/ mm^2) e carga de placas (% área) no córtex e hipocampo.

3.3.17. Estatística

As diferenças foram analisadas por ANOVA de dois fatores e pelo Teste T de Student para amostras independentes. O software SPSS v.24 foi utilizado para todas as estatísticas.

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1. Ressonância Magnética Nuclear

3.4.1.1. pNDIp

A obtenção do ligante pNDIp foi confirmada por espectroscopia de RMN. O ligante pNDIp e os hidrogênios e carbonos da sua estrutura estão dispostos na Figura 18. O espectro de RMN ^1H obtido para o ligante pNDIp está apresentado na Figura 29.

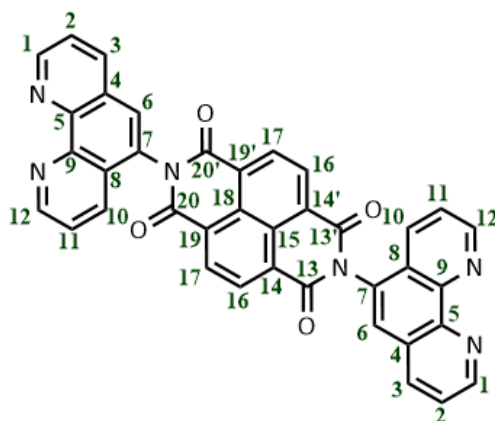


FIGURA 29. Atribuição dos hidrogênios e carbonos presentes na estrutura do ligante pNDIp

O espectro de RMN ^1H obtido para o ligante pNDIp está apresentado na Figura 30. Na estrutura da porção naftaleno diimida existem apenas quatro hidrogênios que são iguais entre si e podem ser observados como uma ressonância singlete em δ 8.82 ppm. Os hidrogênios de ambas as fenantrolinas aparecem entre δ 7.70 – 9.30 ppm. Exceto pelo H_6 , que não possui hidrogênios adjacentes, todos os demais aparecem na forma de duplo-duplete ou multiplete referentes a 2H por ressonância.

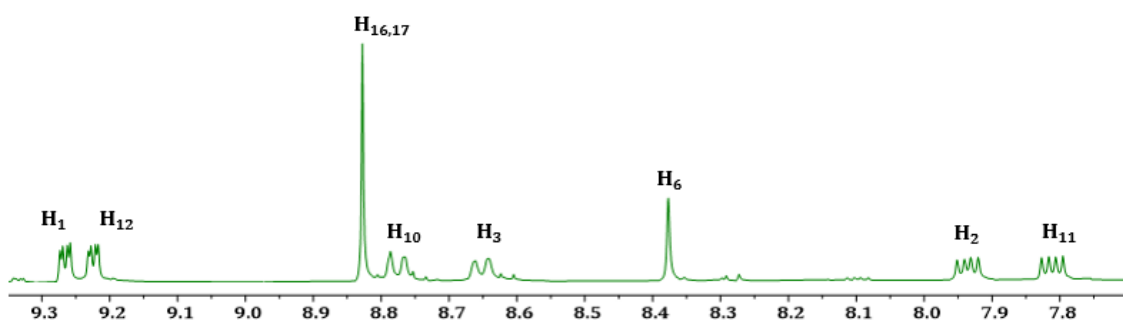


FIGURA 30. Espectro de RMN de ^1H para a região desblindada do ligante pNDIp

A estrutura do ligante pNDIp também foi confirmada com o auxílio de técnicas 2D, como ^1H - ^1H COSY (Figura 31), ^1H - $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ HSCQ (Figura 32) e RMN ^1H - $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ HMBC (Figura 33). As atribuições para cada hidrogênio, deslocamento químico (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (Hz) e a integração dos sinais de RMN estão dispostos na Tabela 2.

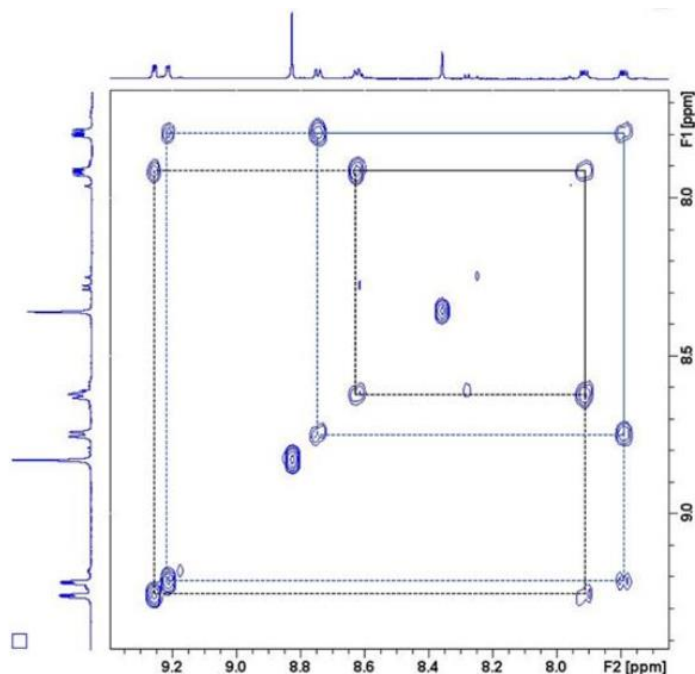


FIGURA 31. Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY da região desblindada do ligante pNDIp em DMSO- d_6 .

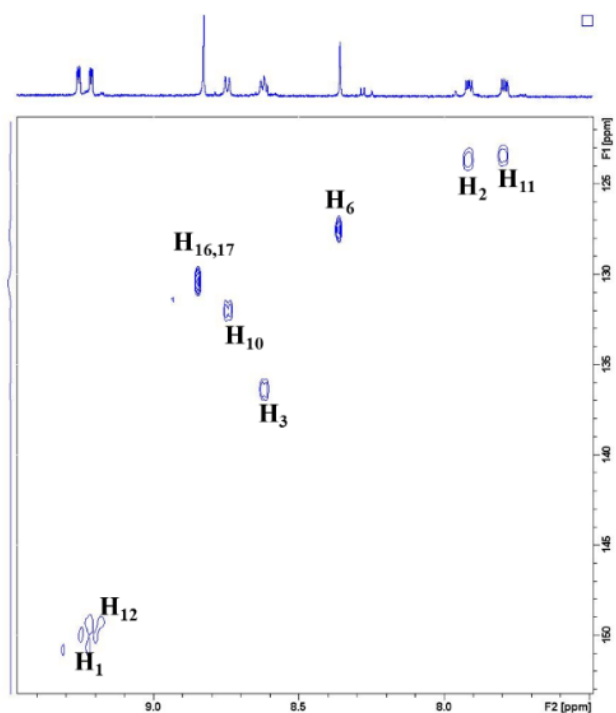


FIGURA 32. Espectro de RMN $^1\text{H} - ^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ HSCQ para a região desblindada do ligante pNDIp em DMSO- d_6 .

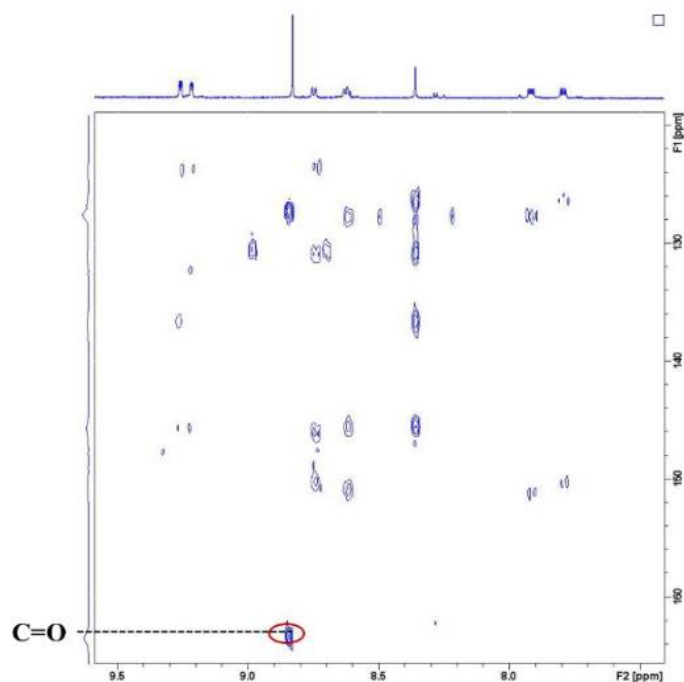


FIGURA 33. Espectros de RMN $^1\text{H} - ^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ HMBC da região desblindada do ligante pNDIp em DMSO- d_6 .

Tabela 3. Atribuições dos espectros de RMN de ^1H obtidos para o ligante pNDIp em DMSO- d_6 . Os respectivos hidrogênios estão apresentados em deslocamento químico (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (Hz) e a quantidade de hidrogênios.

| Nº | ^{13}C – HSQC | ^1H | ^1H - ^{13}C – HMBC |
|------------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| C1, H1 | 151.0 | 9.25; dd (1.59; 4.33); 2H | |
| C2, H2 | 123.7 | 7.91; dd (4.33; 7.95); 2H | |
| C3, H3 | 136.3 | 8.60 – 8.63; m; 2H | |
| C4 | 127.7 | -- | 7.91 (H2') |
| C5 | 145.5 | -- | 8.62 (H3') |
| C6, H6 | 127.5 | 8.35; s; 2H | |
| C7 | Nd | -- | |
| C8 | 126.3 | -- | 7.78 (H11') |
| C9 | 146.1 | -- | 8.74 (H10') |
| C10, H10 | 132.0 | 8.74; db (8.30); 2H | |
| C11, H11 | 123.4 | 7.78; dd (4.15; 8.30); 2H | |
| C12, H12 | 150.4 | 9.21; dd (1.51; 4.15); 2H | |
| C20, C20'; C13, 13' (C=O) | 163.3 | -- | 8.82 (H17, H16) |
| C19, C19'; C14, C14' | 127.4 | -- | 8.82 (H17, H16) |
| C15; C18 | Nd | -- | |
| C17, H17; C16, H16 | 130.4 | 8.82; s; 4H | |

3.4.1.2. RuNDI

A obtenção e pureza do complexo RuNDI foi confirmada por espectroscopia de RMN. O complexo RuNDI está apresentado na Figura 34, junto dos hidrogênios e carbonos em sua estrutura.

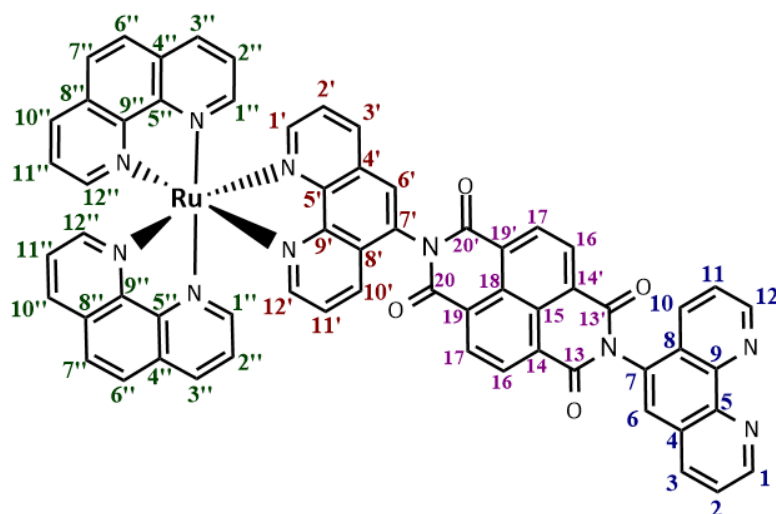


FIGURA 34. Atribuição dos hidrogênios e carbonos presentes na estrutura do complexo RuNDI

A espectroscopia de RMN de ^1H do complexo mostra uma sobreposição no sinal da fenantrolinas coordenadas ao metal, resultado da baixa simetria da molécula. Os espectros apresentados na Figura 35 mostram que H_1 e H_{12} não sofrem alterações no deslocamento químico, isso por não estar coordenado ao metal. Entretanto, o sinal que antes correspondia a dois hidrogênios por ressonância, agora representa apenas um, indicando a coordenação do ligante ao rutênio.

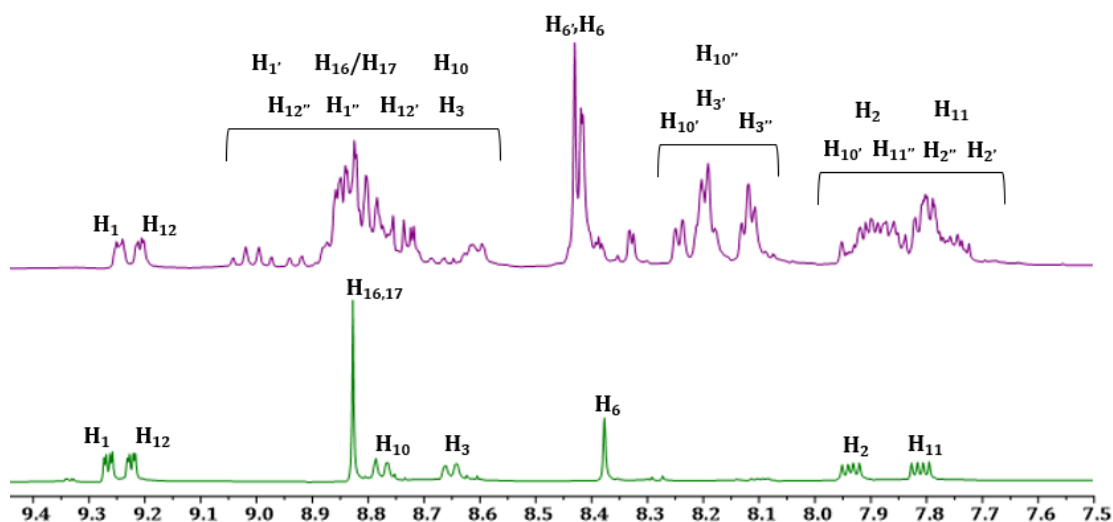


FIGURA 35. Espectros de RMN de ^1H para a região desblindada do complexo RuNDI (roxo) e do ligante pNDIp (verde)

Apenas o espectro de RMN de ^1H não é suficiente para atribuímos todos os respectivos hidrogênios devido à complexidade dos sinais das fenantrolinas. Assim, a estrutura do complexo RuNDI também foi confirmada com o auxílio de técnicas 2D, como ^1H - ^1H COSY (Figura 36), ^1H - $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ HSCQ (Figura 37) e RMN ^1H - $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ HMBC (Figura 38).

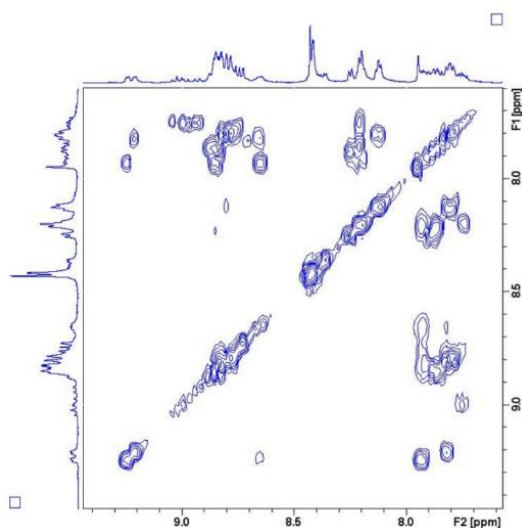


FIGURA 36. Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY da região desblindada do complexo RuNDI em DMSO- d_6 .

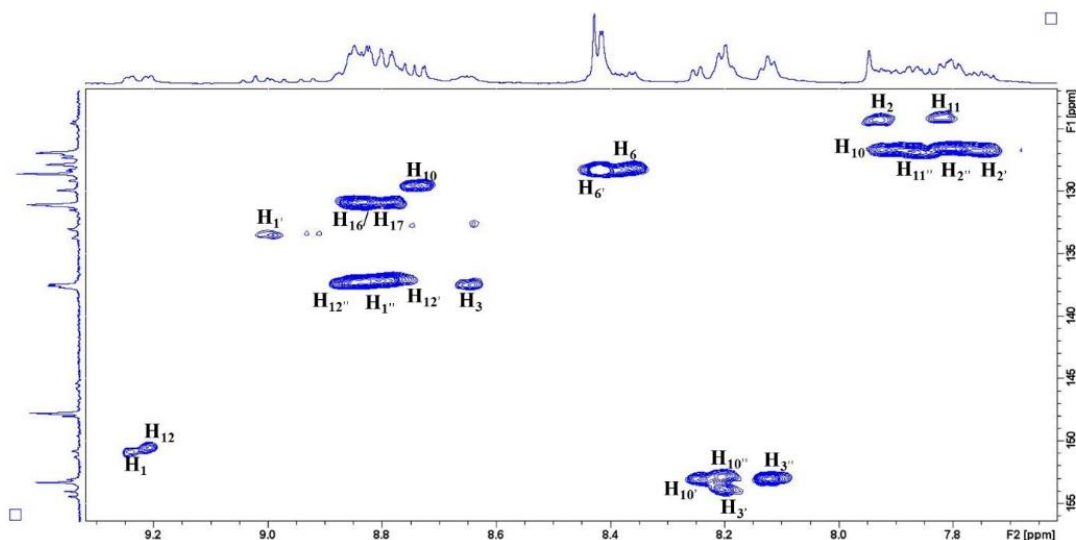


FIGURA 37. Espectro de RMN 1H – 13C{1H} HSCQ para a região desblindada do complexo RuNDI em DMSO-d6.

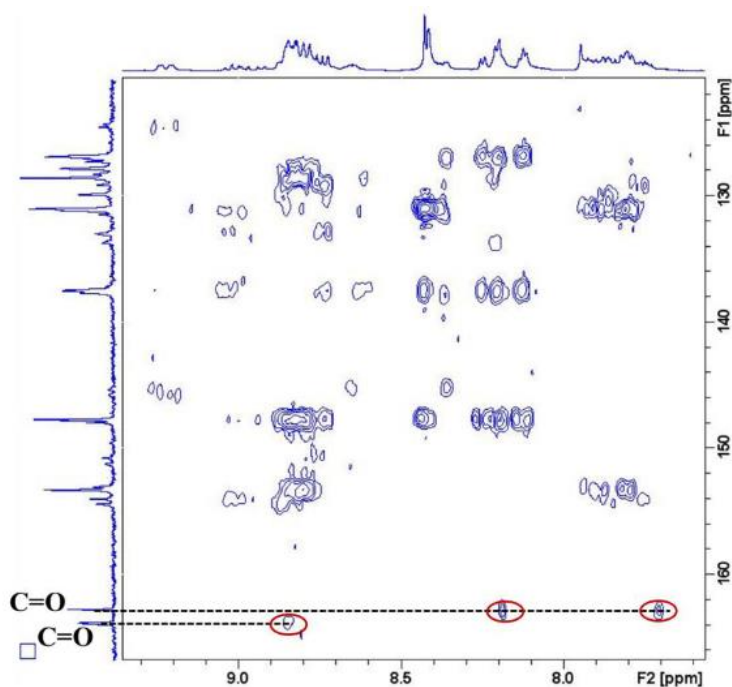


FIGURA 38. Espectros de RMN 1H – 13C{1H} HMBC da região desblindada do complexo RuNDI em DMSO-d6.

As atribuições para cada hidrogênio, deslocamento químico (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (Hz) e a integração dos sinais de RMN estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4. Atribuições dos espectros de RMN de ^1H obtidos para o complexo RuNDI em DMSO- d_6 . Os hidrogênios estão apresentados em deslocamento químico (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (Hz) e a quantidade de hidrogênios.

| | Nº | ^{13}C - HSQC | ^1H | ^1H - ^{13}C – HMBC |
|-------------------------|--------------|------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| phen | C1'', H1'' | 137.1 | 8.81 – 8.84; m; 2H | |
| | C2'', H2'' | 126.5 | 7.77 – 7.83; m; 2H | |
| | C3'', H3'' | 153.0 | 8.08 – 8.15; m; 2H | |
| | C4'' | 130.2 – 131.6 | | |
| | C5'' | 147.7 | | 8.13 (H3'') |
| | C6'', H6'' | 128.5 | 8.40 – 8.44; m; 2H | |
| | C7'', H7'' | 128.5 | 8.40 – 8.44; m; 2H | |
| | C8'' | 130.2 - 131.6 | | |
| | C9'' | 147.7 | | 8.21 (H12'') |
| | C10'', H10'' | 137.3 | 8.83 – 8.89; m; 2H | |
| | C11'', H11'' | 126.8 | 7.84 – 7.89; m; 2H | |
| | C12'', H12'' | 152.8 | 8.17 – 8.23; m; 2H | |
| pNDIp (phen coordenada) | C1', H1' | 133.5 | 8.97 – 9.02; m; 1H | |
| | C2', H2' | 126.7 | 7.71 – 7.78; m; 1H | |
| | C3', H3' | 153.9 | 8.18 – 8.22; m; 1H | |
| | C4' | 130.2 – 131.6 | | |
| | C5' | 147.7 | | 8.21 (H3') |
| | C6', H6' | 128.2 | 8.40 – 8.44; m; 1H | |
| | C7' | Nd | | |
| | C8' | 130.2 – 131.6 | | |
| | C9' | 147.7 | | 8.25 (H12') |
| | C10', H10' | 137.3 | 8.76 – 8.81; m; 1H | |
| | C11', H11' | 127.1 | 7.89 – 7.95; m; 1H | |
| | C12', H12' | 153.0 | 8.23 – 8.27; m; 1H | |

| | | | |
|------------------------------------|--------------------|---------------|----------------------------|
| Naftaleno | C20, C20' (C=O) | 163.9 | 8.19 (H12'), 7.70 (H2') |
| | C19, C19' | Nd | |
| | C18 | Nd | |
| | C17, H17 | 130.8 | 8.77 – 8.81; m; 2H |
| | C16, H16 | 130.8 | 8.80 – 8.88; m; 2H |
| | C15 | Nd | |
| | C14/C14' | Nd | |
| | C13, C13' | 163.8 | 8.85 (H16; H16') |
| pNDIp (phen não coordenada) | C1, H1 | 150.9 | 9.22 – 9.26; m; 1H |
| | C2, H2 | 124.3 | 7.90 – 7.96; m; 1H |
| | C3, H3 | 137.5 | 8.62 – 8.67; m; 1H |
| | C4 | 130.2 – 131.6 | |
| | C5 | 145.2 | 8.65 (H3); 9.25 (H1) |
| | C6, H6 | 128.1 | 8.34 – 8.39; m; 1H |
| | C7 | Nd | |
| | C8 | 130.2 – 131.6 | |
| | C9 | 145.1 | 8.36 (H6); 9.20 (H10) |
| | C10, H10 | 150.5 | 9.19 – 9.22; m; 1H |
| | C11, H11 | 124.1 | 7.80 – 7.84; m; 1H |
| | C12, H12 | 129.5 | 8.71 – 8.77; m; 1H |

3.4.2. Espectroscopia de Absorção e Luminescência

O espectro de absorção eletrônica na região do UV-visível obtido para o complexo RuNDI em PBS (10 mM, NaCl 137 mM, pH 7.4) é resultado da somatória das absorções da porção $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ e do ligante pNDIp. Isso sugere que a incorporação do anel naftaleno diimida ao sistema não afeta a intensidade do campo cristalino, e a díade é capaz de assimilar as propriedades de ambas.

A díade é composta pelas absorções características das partes que a compõe (Figura 39). A primeira banda com máximo em 265 nm está associada à transição de transferência de carga interna (ILCT), $\pi \rightarrow \pi^*$, das fenantrolinas. As bandas em 365 e 385 nm, também de caráter $\pi \rightarrow \pi^*$, correspondem às transições ILCT do ligante pNDIp. E por fim, a banda com máximo em 450 nm refere-se à transição de transferência de carga do metal para o ligante (MLCT) de natureza $d\pi, \text{Ru}(\text{II}) \rightarrow \pi^*, \text{phen}$.

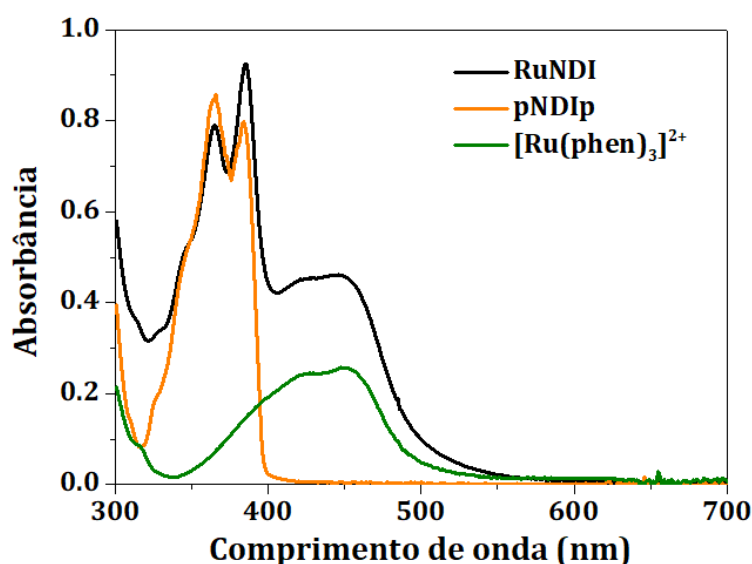


FIGURA 39. Espectros de absorção do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (verde), do ligante pNDIp (vermelho) e do complexo RuNDI (preto)

Os valores de absorvidade molar para o complexo RuNDI em PBS foram determinados a partir da inclinação da curva de calibração (Figura 40), obtida para cada pico de absorção em diferentes concentrações (inset). Os valores de ϵ para cada transição eletrônica estão organizados na tabela 5.

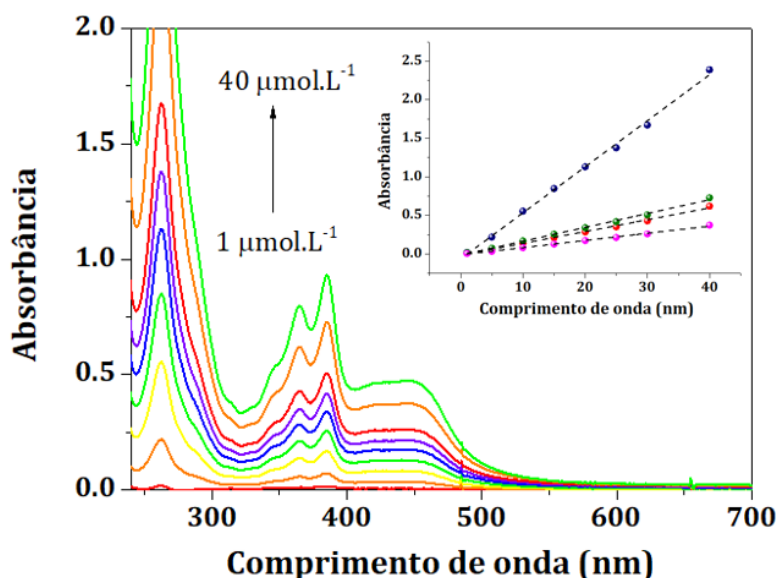


FIGURA 40. Curva de calibração para o complexo RuNDI com concentrações entre 0 - 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. inset: retas obtidas para o aumento da absorbância de acordo com o aumento da concentração molar em 265 nm (azul). 365 nm (vermelho), 385 nm (verde) e 450 nm (rosa)

Tabela 5. Valores de absorvidade molar ($\text{mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) para as transições eletrônicas do complexo RuNDI em PBS.

| | 260 nm | 365 nm | 385 nm | 450 nm |
|---|--------|--------|--------|--------|
| ϵ ($\text{mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) | 59.700 | 15.300 | 17.900 | 9.300 |

Quando excitado em 450 nm, região de absorção da MLCT, o complexo RuNDI apresenta uma banda de emissão intensa com máximo em 600 nm, que vai de 550 nm a 750 nm, como observado na Figura 43A. A emissão do ligante pNDIp é suprimida após a coordenação.

Um estudo de concentração foi realizado para determinar a melhor faixa de trabalho para o complexo, evitando qualquer tipo de influências da concentração (Figura 41A), como propensão a agregação ou efeito de filtro. Pela saturação na resposta emissiva do complexo, nota-se que a melhor faixa de concentração para se trabalhar é entre 0 e 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 41B).

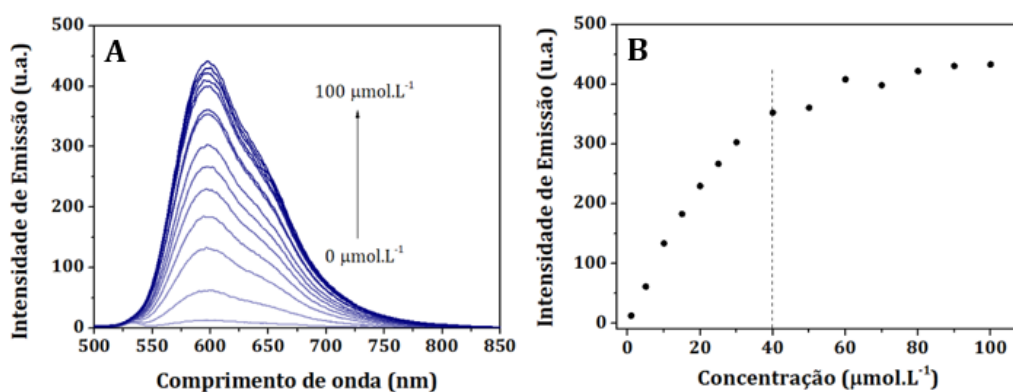


FIGURA 41. Espectros de emissão do complexo RuNDI em diferentes concentrações (0 - 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) (A) e o comportamento da resposta emissiva com o aumento da concentração (B).

O complexo RuNDI ainda dispõe de um deslocamento de Stokes na ordem de 5300 cm^{-1} em solução aquosa, como mostrado na Figura 42.

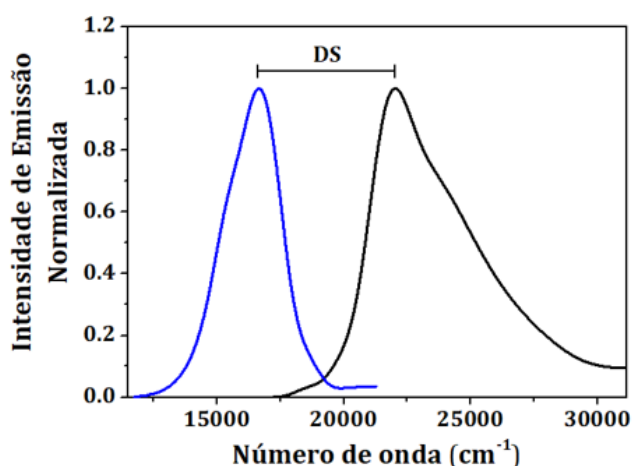


FIGURA 42. Deslocamento de Stokes entre a emissão (azul) e excitação (preto) obtidos para o complexo RuNDI em PBS.

3.4.3. Marcador amiloide

O complexo RuNDI parece, num primeiro momento, não alterar a formação do íon tirosinato durante a formação de fibrilas amiloides. Entretanto, mostrou comportamentos interessantes em ensaios *ex-situ*. Após a adição do complexo à fibrilas pré-formadas os espectros da Figura 43A mostram um aumento na intensidade da emissão em 340 nm, previamente atribuído à formação do íon tirosinato via ligações de hidrogênio. Esse aumento pode ser explicado pelo estabelecimento de ligações de hidrogênio entre o hidrogênio do grupo fenólico da Tyr10 e os oxigênios do ligante pNDI_p.

Além da possível interação entre o ligante pNDI_p e o grupo fenólico da Tyr10, a resposta emissiva da banda de MLCT também sofre alterações. A emissão do complexo RuNDI, com máximo em 600 nm, aumenta significativamente na presença de fibrilas do peptídeo A β , como mostrado na Figura 43B.

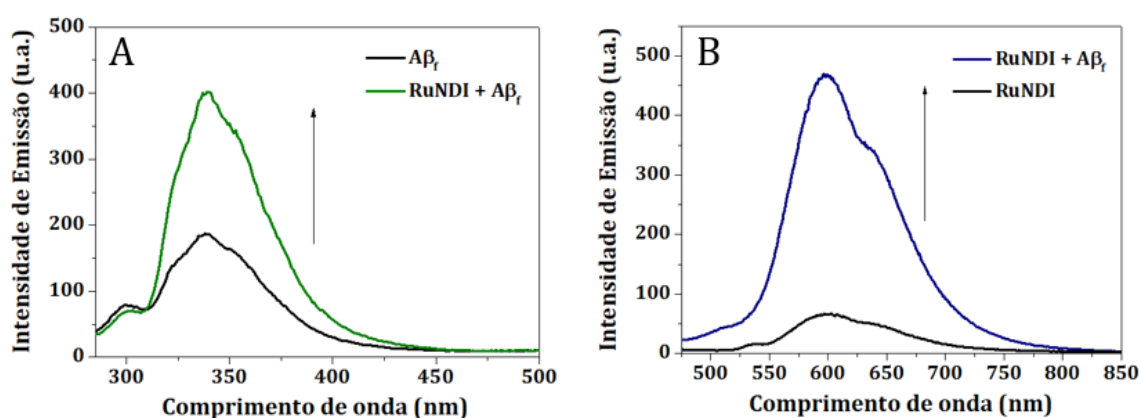


FIGURA 43. Espectros de emissão obtidos após a adição do complexo RuNDI à fibrilas pré-formadas do peptídeo A β em (A) 340 nm e (B) 600 nm.

3.4.4. Nefelometria

A nefelometria é uma técnica alternativa ao uso de corantes amiloides. É comumente utilizada para medir a concentração de partículas em suspensão com base na dispersão da luz incidente. Partículas presentes em uma amostra podem dispersar a luz dependendo do tamanho, da forma ou da concentração em solução, em suma, a nefelometria monitora a turbidez da solução à medida que agregados vão se formando.

Pelas curvas observadas na Figura 44 o complexo RuNDI demonstra efeito significativo na formação de agregados do peptídeo $A\beta_{42}$. Amostras incubadas em proporções 1:2 e 1:5 ($A\beta_{42}$ /RuNDI) mostraram valores reduzidos de Unidades Relativas de Nefelometria (URNs) quando comparadas ao controle. Além disso, o efeito observado é dependente da concentração de complexo em solução.

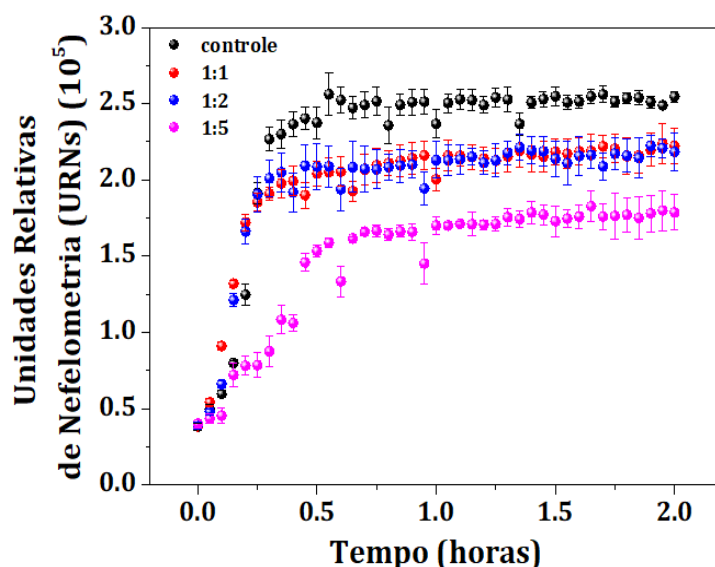


FIGURA 44. Nefelometria do processo de agregação do peptídeo $A\beta$ na ausência e na presença do complexo RuNDI em diferentes proporções.

3.4.5. Dicroísmo Circular

Os espectros de CD obtidos para agregação do peptídeo A β mostram uma absorção com mínimo em 218 nm característica da formação de folhas- β e, nesse caso, de fibrilas amiloides (Figura 45). Entretanto, os espectros obtidos para incubação *in situ* com o complexo RuNDI em proporções 1:1 e 1:5 sugerem um desvio na agregação do peptídeo A β que não leva à formação de folhas- β e este efeito é dependente da concentração.

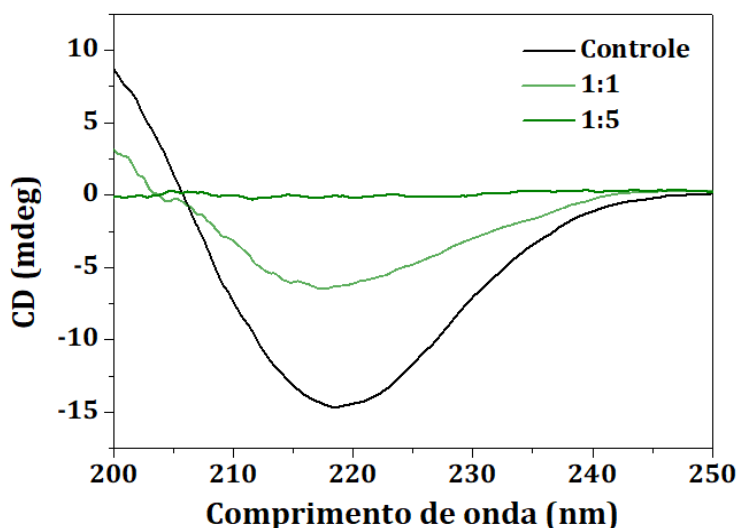


FIGURA 45. Espectros de dicroísmo circular obtidos ao final da agregação do peptídeo A β na ausência e presença do complexo RuNDI em diferentes proporções

3.4.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As imagens de TEM confirmam os resultados observados para nefelometria e dicroísmo circular. A formação de fibrilas amiloides é prejudicado na presença do complexo RuNDI em altas concentrações - 1:5 (Complexo : amiloide). As imagens obtidas para a agregação do peptídeo β A mostram a formação de estruturas fibrilares, enquanto a

adição do complexo RuNDI de fato modula a fibrilação do $A\beta_{42}$ levando a formação de agregados amorfos (Figura 46).

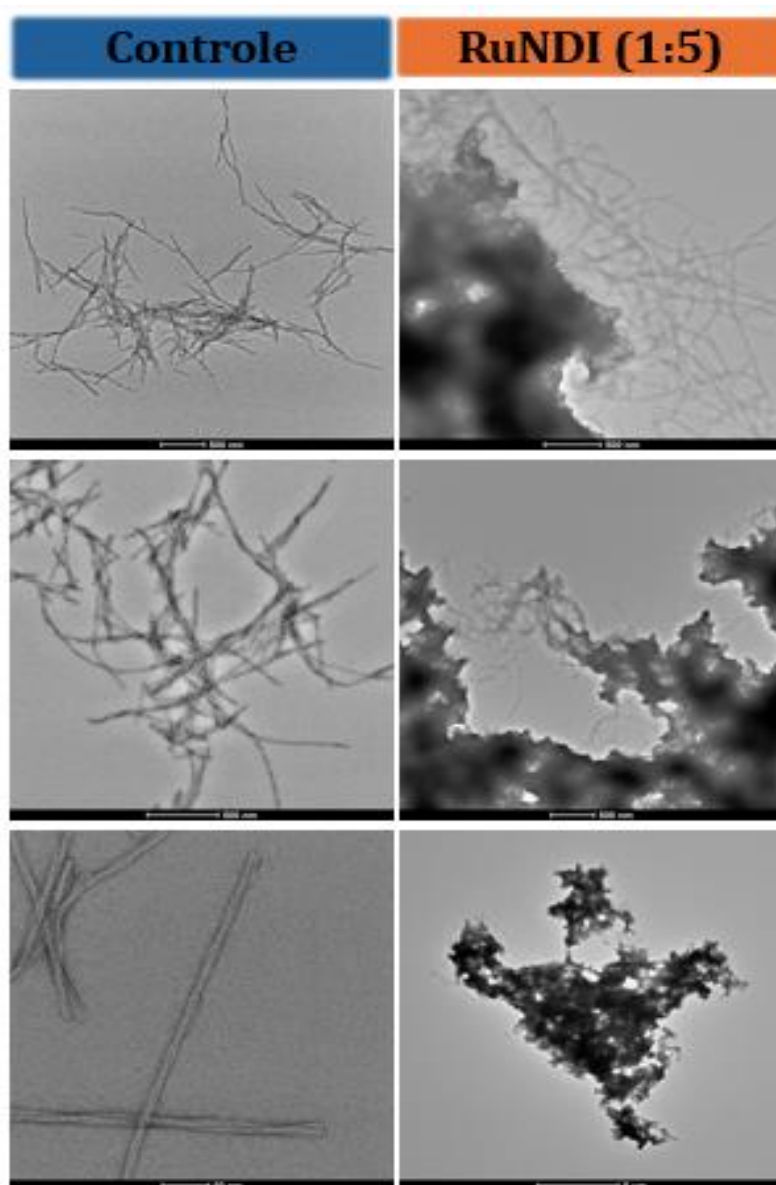


FIGURA 46. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das estruturas formadas na agregação do peptídeo $A\beta$ na ausência e na presença do complexo RuNDI (1:5).

Agregados amorfos do βA já são reportados na presença de complexos de metais de transição. Entretanto, o mecanismo de ação envolve a coordenação de resíduos de histidina presentes na estrutura da proteína aos sítios de ligação livre do metal através de uma ligação

covalente. O problema de interações desse tipo é a falta de especificidade, levando a interações não seletivas com outras espécies em meio biológico e culminando na perda de eficácia ou efeitos secundários indesejados.

Até então, os dados de nefelometria e TEM mostram menor formação de agregados amiloides e os espectros de CD sugerem que os agregados formados não são intermediados por folhas- β , estrutura organizada e termodinamicamente estável característica da agregação do A β . Uma justificativa plausível para este comportamento pode ser a formação de ligações de hidrogênio entre o ligante pNDI_p e a Tyr10 que prejudicam a formação de grandes agregados.

Além disso, o complexo também apresentou mudanças no comportamento emissivo na presença de espécies fibrilares do A β , possibilitando seu uso como sonda luminescente.

3.4.7. Microscopia Multifotônica

A microscopia MMF permitiu o segmento de placas amiloides em tempo real em camundongos transgênicos do tipo APP/PS1-Controle e APP/PS1-RuNDI por 6 semanas. As imagens mostram, em azul, depósitos amiloides e em vermelho, vasos e microvasos sanguíneos.

As imagens apresentadas na Figura 47 mostram os angiogramas, e o seguimento de placas amiloides ao longo de 6 semanas. A partir da análise das imagens, parâmetros como tamanho de placas (μm^2) e carga de placas (% área) foram obtidos para ambos os grupos.

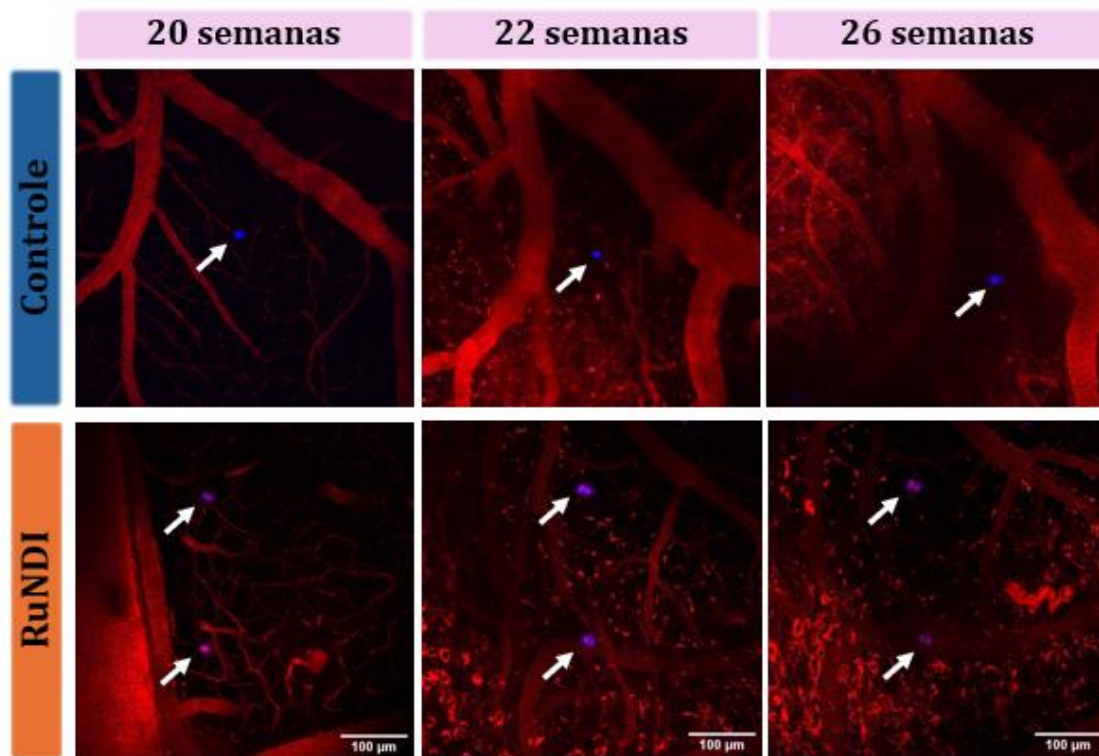


FIGURA 47. Imagens representativas de microscopia multifotônica de vasos sanguíneos marcados com Texas-Red (vermelho) e depósitos amiloides marcados com Methoxy-XO4 (azul). Imagens coletadas para um camundongo APP/PS1-Controle (azul) e para um camundongo APP/PS1-RuNDI (1 mg/kg/dia) (laranja).

As placas amiloides deveriam ser acompanhadas até as 30 semanas de idade de cada camundongo APP/PS1. Entretanto, um tempo muito longo para a realização desse tipo de experimento pode levar a regeneração dos tecidos e do crânio desses animais. Isso teria feito com que o acompanhamento ao longo das semanas fosse prejudicado, aumentando a dispersão de luz e perda de foco. Por esse motivo, os depósitos amiloides encontrados foram acompanhados apenas até as 26 semanas de idade.

O tamanho das placas encontradas não foi significativamente afetado pelo tratamento com RuNDI quando analisado semanalmente

(Figura 48A), em tempo real, por microscopia multifotônica. Nenhum efeito de interação tratamento x sessão foi observado [$F(3,200)=1,296$, $p=0,277$] e a avaliação semanal individual não revelou diferenças (semana 20: $p=0,095$; semana 22: $p=0,395$; semana 24: $p=0,431$; semana 26: $p=0,456$). Os dados são representativos de 3 camundongos por grupo e 21-39 placas.

O mesmo comportamento foi observado para a carga de placas (% área), [$F(3,64)=0,367$, $p=0,777$] (Figura 48B). A avaliação semanal individual também não revelou diferenças (semana 20: $p=0,693$; semana 22: $p=0,391$; semana 24: $p=0,621$; semana 26: $p=0,662$). Os dados são representativos de 3 camundongos por grupo e 4-23 campos. As diferenças foram analisadas por ANOVA de dois fatores (tratamento x sessão) e pelo Teste T de Student para amostras independentes.

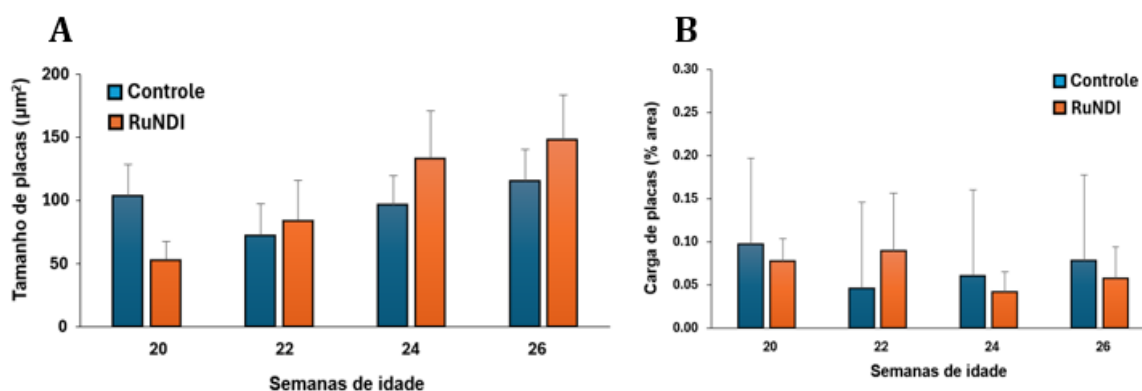


FIGURA 48. (A) Tamanho de placas amiloides (μm^2) e (B) Carga de placas amiloides (%) para camundongos APP/PS1-Controle (Azul) e APP/PS1-RuNDI (Laranja). Nenhuma diferença estatística observada.

Os resultados obtidos através da MMF são inconclusivos quanto aos efeitos do complexo RuNDI *in vivo* ao longo das semanas .

3.4.8. Peso Corporal e Cerebral

O peso corporal dos camundongos dos quatro grupos experimentais foi monitorado durante todo o tratamento, para ajuste de dose do tratamento com o complexo e para garantir o bem-estar dos animais.

Durante as 10 semanas de tratamento contínuo não foi observado nenhuma anomalia quanto ao peso corporal dos animais. Todos os grupos apresentaram um aumento linear condizente com o amadurecimento dos camundongos, apesar dos grupos que receberam o tratamento apresentarem maior peso corporal quando comparados aos respectivos controles (Figura 49).

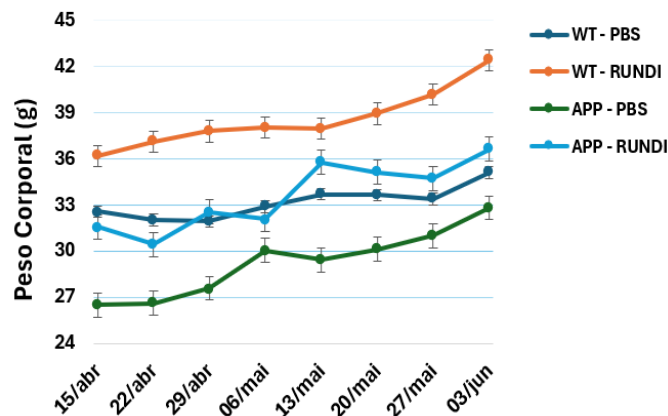


FIGURA 49. Peso corporal dos camundongos WT com (laranja) e sem (azul escuro) tratamento e de camundongos APP/PS1 com (azul claro) e sem (verde) tratamento com o complexo RuNDI durante as 10 semanas de experimento.

Após atingirem 30 semanas de idade os camundongos foram sacrificados para coleta de amostras de sangue e de tecido cerebral. Os cérebros foram pesados logo que coletados para avaliar possíveis efeitos sobre o cérebro, como atrofia cerebral ou outras mudanças

morfológicas. Também não foram observadas diferenças estatísticas significantes para o peso cerebral dos camundongos tratados com o complexo RuNDI quando comparados ao grupo controle (Figura 50).

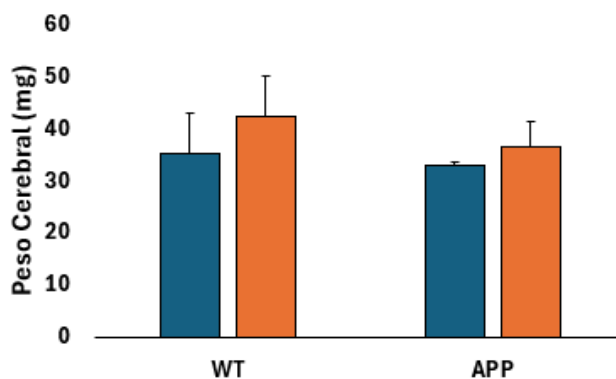


FIGURA 50. Peso cerebral dos camundongos WT e APP/PS1 com (laranja) e sem (azul) tratamento com o complexo RuNDI.

3.4.9. ELISA

Os ensaios de ELISA são amplamente utilizados para detectar e quantificar a presença de proteínas, anticorpos ou antígenos em amostras biológicas. Neste caso, a técnica foi utilizada para quantificar as espécies solúveis do peptídeo A β em amostras de plasma e tecido cortical, bem como as espécies insolúveis presentes no tecido cortical.

Nenhuma diferença foi detectada quando os níveis de A β ₄₀ (p=0,376) ou A β ₄₂ (p=0,498) solúveis no plasma foram comparados entre os camundongos APP/PS1-Controle e APP/PS1-RuNDI (Figura 51). Os dados são representativos de 4 camundongos por grupo e as diferenças foram analisadas pelo Teste T de Student para amostras independentes.

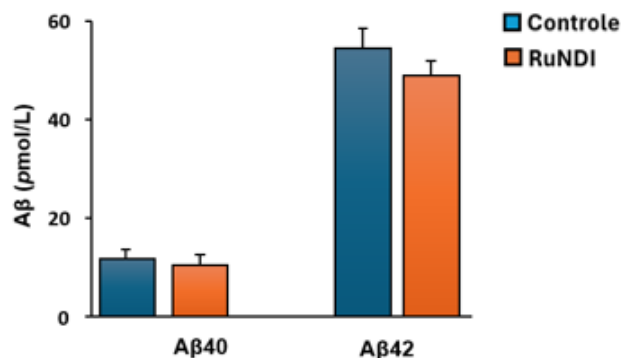


FIGURA 51. Níveis de Aβ40-42 solúveis (pmol/L) em amostras de plasma sanguíneo para camundongos APP/PS1-Controle (Azul) e APP/PS1-RuNDI (Laranja).

A avaliação dos níveis de Aβ solúvel em amostras de córtex somatossensorial não revelou diferenças significativas quando os níveis de Aβ₄₀ solúvel (p=0,495) ou Aβ₄₂ (p=0,304) foram comparados entre os camundongos APP/PS1 e APP/PS1 tratados com RuNDI (Figura 52A).

Entretanto, níveis ligeiramente mais baixos de Aβ₄₀ (p=0,143) e Aβ₄₂ (p=0,170) insolúvel foram detectados no córtex dos camundongos tratados com RuNDI, embora as diferenças não tenham atingido significância estatística (Figura 52B). Diferenças foram analisadas pelo Teste T de Student para amostras independentes (n = 4).

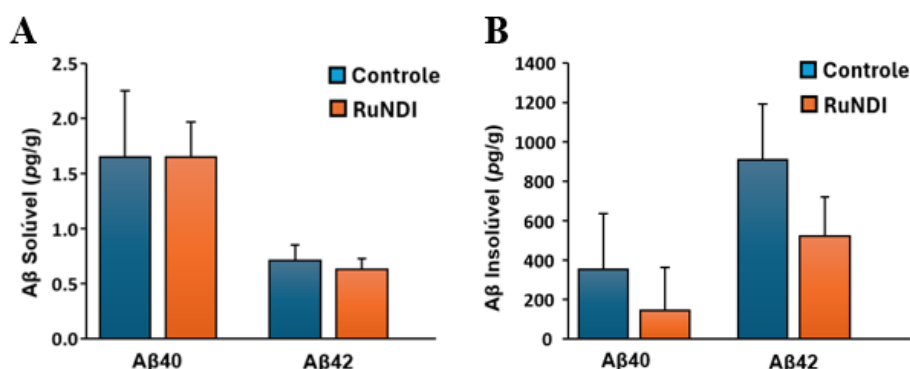


FIGURA 52. Níveis de Aβ40-42 (A) solúveis (pg/g) e (B) insolúveis (pg/g) em amostras de córtex para camundongos APP/PS1-Controle (Azul) e APP/PS1-RuNDI (Laranja).

3.4.10. Imunofluorescência

Semelhante ao ensaio de ELISA, a imunofluorescência também é usada para detectar e quantificar a presença de proteínas e antígenos em amostras biológicas, neste caso em tecido cerebral. O ELISA é uma técnica colorimétrica, enquanto a imunofluorescência é uma técnica de imagem.

O princípio de ambas é basicamente o mesmo, a detecção de proteínas ou antígenos específicos por anticorpos marcados. O anticorpo 4G8 e a Tioflavina-S (ThS) são amplamente utilizados no estudo de agregados proteicos, como os encontrados na DA. O 4G8 reconhece a sequência 17-24 do peptídeo A β , isso permite a identificação dos três estágios da agregação amiloide: os agregados fibrilares densos, os depósitos difusos não fibrilares e precursores de placas. Já a ThS se liga especificamente a estruturas amiloides de maneira geral, independente da especificidade, contanto que apresentem conformação de folha- β pregueada.

3.4.10.1. Córtex

As seções de córtex coletadas do cérebro de camundongos APP/PS1-Controle e APP/PS1-RuNDI (1mg/kg/dia) submetidas à processos de coloração com Tioflavina-S e com o anticorpo monoclonal 4G8 mostram, em verde, depósitos fibrilares densos marcados pela ThS, ao passo que em vermelho estão marcados por 4G8 depósitos densos e difusos (Figura 53).

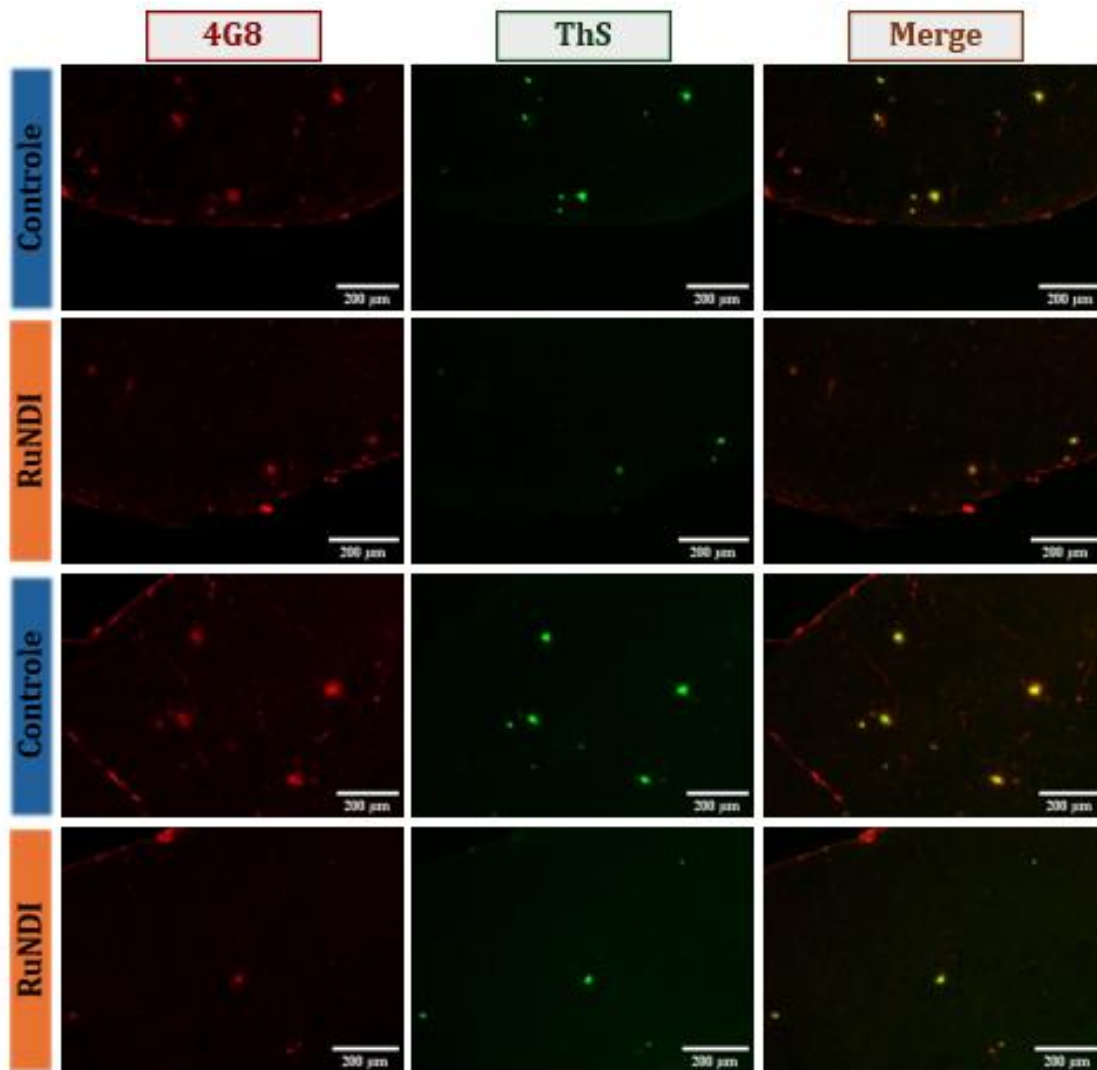


FIGURA 53. Imagens representativas de microscopia de fluorescência de seções do córtex de camundongos APP/PS1-Controle (azul) e APP/PS1-RuNDI (1mg/kg/dia), laranja. Depósitos amiloides foram marcados com ThS (λ_{ex} : 495nm; λ_{em} : 519nm), em verde e 4G8 (λ_{ex} : 540nm; λ_{em} : 575nm), em vermelho.

O tratamento com RuNDI em camundongos APP/PS1 não afetou o tamanho das placas analisadas pela coloração com ThS ($p=0,421$) ou pela imunofluorescência com 4G8 ($p=0,325$), como observado na figura 54A. No entanto, o tratamento com RuNDI em camundongos APP/PS1 reduziu significativamente a densidade das placas amiloides no córtex (Figura 54B), ThS (** $p<0,0001$ vs. APP/PS1) e 4G8 (** $p<0,0001$ vs. APP/PS1).

Além disso, também reduziu significativamente a carga de placas amiloides (Figura 54C), ThS (** $p < 0,0001$ vs. APP/PS1) ou 4G8 (** $p < 0,0001$ vs. APP/PS1). Os dados são representativos de 4 camundongos por grupo.

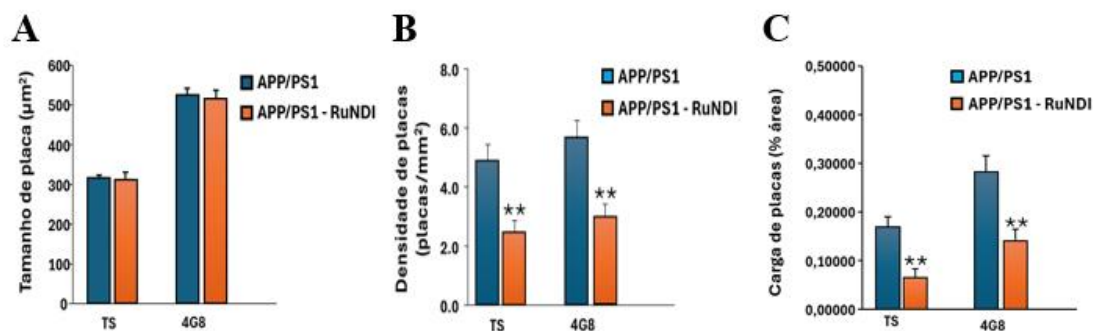


FIGURA 54. Parâmetros obtidos pela análise das imagens representativas do córtex de camundongos APP/PS1-Controle (Azul) e APP/PS1-RuNDI (Laranja) marcados com ThS e 4G8. (A) Tamanho de placas (μm^2); (B) Densidade de placas (número de placas/ mm^2) e (C) Carga de placas (% área).

3.4.10.2. Hipocampo

A Figura 55 mostra as seções de hipocampo do cérebro de camundongos APP/PS1-Controle e APP/PS1-RuNDI (1mg/kg/dia) que foram submetidas à processos de coloração com ThS e com o anticorpo 4G8.

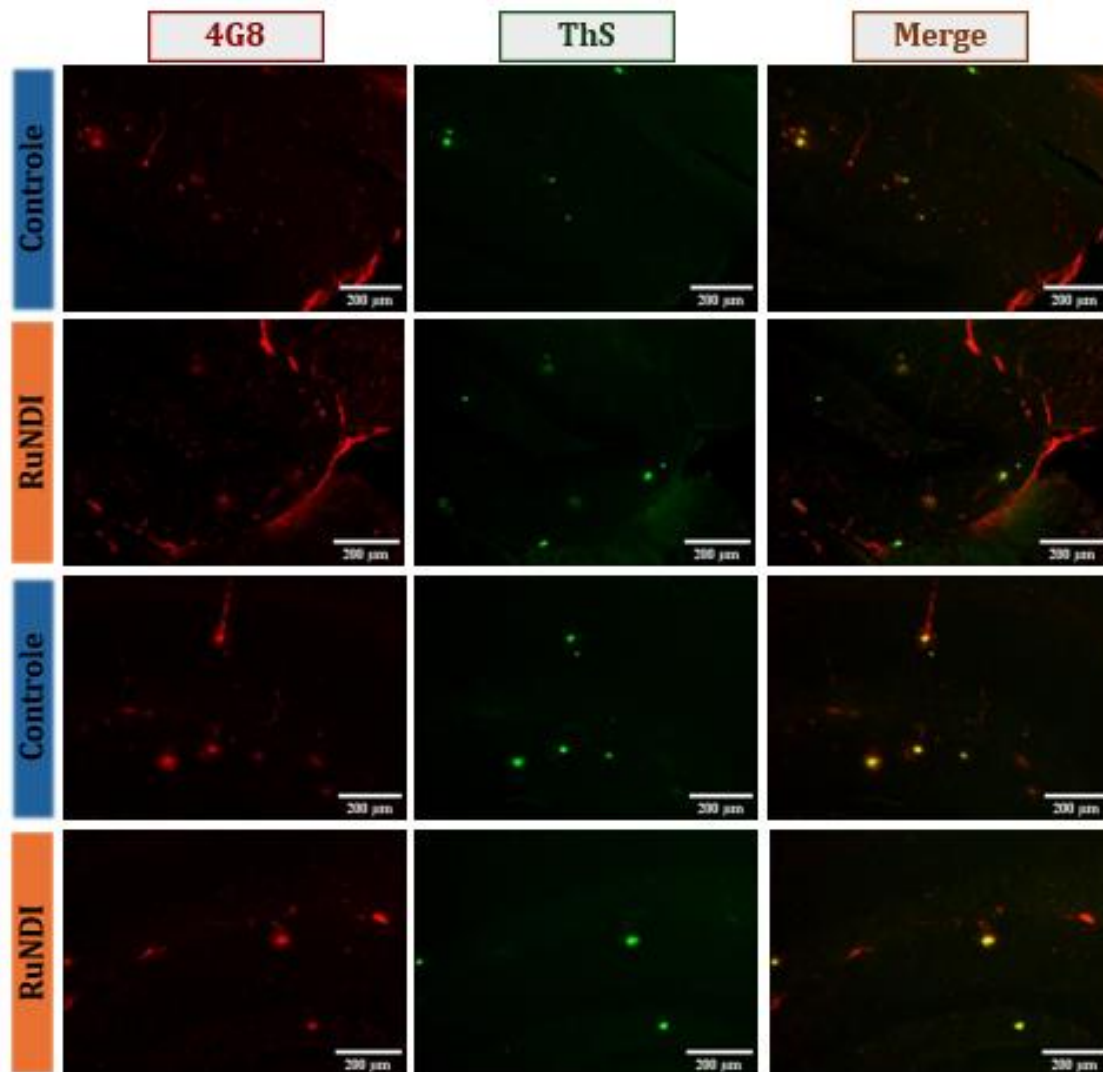


FIGURA 55. Imagens representativas de microscopia de fluorescência de seções do hipocampo de camundongos APP/PS1-Controle (azul) e APP/PS1-RuNDI (1mg/kg/dia), laranja. Depósitos amiloides foram marcados com ThS (λ_{ex} : 495nm; λ_{em} : 519nm), em verde e 4G8 (λ_{ex} : 540nm; λ_{em} : 575nm), em vermelho.

As análises para o hipocampo mostraram comportamento similar àquele observado para tamanho de placas no córtex. A Figura 56A mostra que o tratamento com o complexo RuNDI não afetou o tamanho das placas, ThS ($p=0,333$) ou 4G8 ($p=0,306$). Porém, reduziu significativamente a densidade das placas amiloides no hipocampo (Figura 56B), ThS ($*p=0,042$ vs. APP/PS1) ou 4G8 ($**p=0,009$ vs. APP/PS1). E na Figura 56C observa-se uma tendência para redução da

carga de placas amiloides no hipocampo após o tratamento com RuNDI em camundongos APP/PS1, embora as diferenças não tenham atingido significância estatística, ThS ($p=0,082$) ou 4G8 ($p=0,057$). Os dados são representativos de 4 camundongos por grupo.

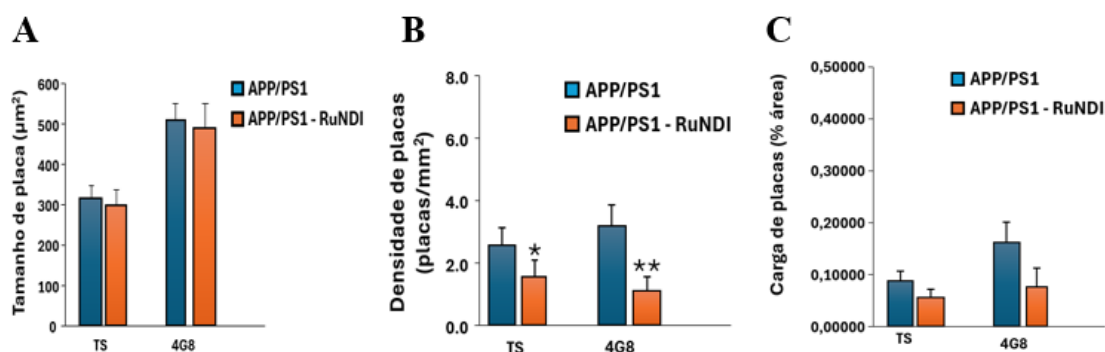


FIGURA 56. Parâmetros obtidos pela análise das imagens representativas do hipocampo de camundongos APP/PS1-Control (Azul) e APP/PS1-RuNDI (Laranja) marcados com ThS e 4G8. (A) Tamanho de placas (μm^2); (B) Densidade de placas (número de placas/ mm^2) e (C) Carga de placas (% área).

O estado da arte para este tipo de estudo foi estabelecido através de uma revisão sistemática da literatura disponível na base de dados PubMed, uma plataforma de acesso livre que indexa milhões de artigos científicos na área de ciências da vida e biomedicina. Foram investigados artigos publicados sem definição de período, utilizando combinações específicas de palavras-chave relacionadas a: (1) Ruthenium; (2) Ruthenium Complexes; (3) Ruthenium compounds; (4) Ruthenium-based drugs; (5) Transgenic mice; (6) Transgenic animals; (7) Animals Models and (7) Alzheimer's Disease.

A busca foi conduzida utilizando critérios de inclusão e exclusão predefinidos, buscando selecionar estudos que abordassem a administração de compostos de rutênio em camundongos modelos da DA. A Tabela 6 resume os trabalhos encontrados durante o processo de

revisão, destacando: o ano de publicação; o composto utilizado e a dose; o método de administração; o modelo animal utilizado e os principais resultados observados.

Tabela 6. Levantamento bibliográficos realizado na plataforma PubMed para aplicação de compostos de Ru(II) em camundongos modelos da doença de Alzheimer. Os trabalhos foram analisados e sumarizados em: Ano; Composto/Dose; Modelo animal; Via de administração e principais resultados.

| ANO | COMPOSTO/DOSE | MODELO | VIA | RESULTADOS |
|------|---|----------------|------------------|---|
| 2020 | NGF-PCM@Ru e RBT-PCM@Ru (20 µg/mL) – dose única | C57BL/6 | Intravenoso | Melhora o déficit cognitivo, reduz EO. |
| 2020 | Ruthenium Red (6 mg/kg/dia) – 18 dias | Sprague-Dawley | Intraperitoneal | Atenua toxicidade mitocondrial e a porcentagem de células apoptóticas. |
| 2021 | Ru360 (2.25 nmol) – 4 dias | Wistar rats | Intraventricular | Melhora o déficit cognitivo, ativando mecanismos de manutenção e estímulo de neurônios. |
| 2023 | PDA-Ru (20 µg/mL) – 1 vez na semana, por duas semanas | APP/PS1 | Intracraniana | Sob NIR melhora memória, modula microglia e alivia neuroinflamação. |
| 2023 | RuO2@Bor (1 mg/kg) – 3 dias | C57BL/6 | Intraventricular | Melhora o déficit cognitivo, elimina deposição de Aβ e alivia EO. |
| 2023 | Ru-HClO (50 µM) – dose única | APP/PS1 | Intracraniana | Monitora a produção de ácido cloroso (HClO). |

Em geral, a maioria dos estudos listados induzem a deposição amiloide ou demência em camundongos do tipo C57BL/6; Wistar Rats ou Sprague-Dawley. Dois estudos utilizam camundongos transgênicos APP/PS1.^{160,161}

Os estudos referenciados demonstram um impacto positivo dos compostos de rutênio sobre os efeitos da demência induzida. Os resultados mais comuns incluem melhora na capacidade cognitiva (aprendizagem e memória) e redução da neuroinflamação.^{162,163} Apenas um dos estudos investigou diretamente a deposição amiloide no hipocampo de camundongos C57BL/6 com deposição induzida, revelando a ausência de formação de depósitos amiloides nessa região após o tratamento com nanopartículas de RuO₂@Bor (1 mg/kg/dia), por três dias.¹⁶⁴

Um dos estudos utilizando ratos Sprague-Dawley com demência induzida, demonstrou que o tratamento contínuo com Rutênio Red (6 mg/kg/dia) durante 18 dias resultou na redução da toxicidade mitocondrial e da morte celular apoptótica.¹⁶⁵

No mesmo sentido, o presente trabalho demonstrou que o complexo RuNDI reduz a deposição de placas amiloides no córtex e hipocampo de camundongos transgênicos APP/PS1. Este estudo avança o conhecimento ao acompanhar a formação de depósitos amiloides após 10 semanas de tratamento contínuo com o complexo RuNDI, na dose de 1 mg/kg/dia, e motiva a exploração de complexos de Ru(II) como potenciais terapêuticos para a DA.

Esse comportamento observado para o complexo RuNDI pode ser atribuído, ao menos em parte, a interações hidrofóbicas entre a estrutura do ligante pNDIp e o núcleo hidrofóbico do peptídeo A β . Essas

interações provavelmente interferem na organização típica da agregação do A β , desviando sua conformação para formas fibrilares amorfas, como demonstrado nos ensaios de dicroísmo circular, nefelometria e TEM. A formação desses agregados não fibrilares pode comprometer a estabilidade das placas amiloides, tornando-as mais suscetíveis à degradação. Assim, as reduções observadas na densidade e na carga de placas amiloides no córtex e no hipocampo de camundongos tratados com o complexo RuNDI podem refletir não apenas um redirecionamento da via de agregação, mas também que os agregados amorfos formados podem ser degradados no ambiente cerebral, impedindo a formação de novos depósitos amiloides.

3.5. Conclusões Finais

Conclui-se a partir das observações experimentais deste trabalho, que o complexo RuApy e a insulina humana atuam como moduladores no processo de agregação do peptídeo A β_{42} , interrompendo o mecanismo de formação de ligações de hidrogênio ao longo do eixo de crescimento das fibrilas através do impedimento estérico ao redor do N-terminal. A conversão da Tyr10 para sua forma aniônica Tyr-O $^-$ está relacionada com a formação e estabilização dessas estruturas e a supressão na formação dessas espécies está relacionada com o desvio na agregação clássica do A β , levando a formação de agregados amorfos e não-tóxicos em células de neuroblastoma.

Por sua vez, o complexo RuNDI demonstrou propriedades moduladoras do processo de agregação do peptídeo A β_{42} , levando à formação de fibrilas amorfas e prejudicando a formação de novos

agregados. Além do aumento significativo da emissão centrada em 600nm na presença de fibrilas do A β ₄₂, indicando uma interação específica com estruturas fibrilares. Em modelo murino transgênico de Alzheimer (APP/PS1), o tratamento com RuNDI resultou em redução significativa da densidade e da carga de placas amiloides no córtex e no hipocampo, o que sugere que os agregados formados são mais susceptíveis à metabolização e remoção, prevenindo a deposição progressiva.

Dessa forma, conclui-se que ambos os complexos apresentam forte potencial como agentes moduladores da fibrilação do A β , com efeitos comprovados *in vitro* e *in vivo*, sendo que o complexo RuNDI se destaca como uma plataforma versátil para abordagens teranósticas em doenças neurodegenerativas.

4.

Referências

"A ciência nunca erra...só as vezes"

Jimmy Neutron

1. Barnham, K. J., Masters, C. L. & Bush, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery* 2004 3:3 3, 205–214 (2004).
2. World Health Organization. Global action plan on the public health response to dementia 2017–2025. *Global action plan on the public health response to dementia 2017–2025* (2017) doi:who-259615.
3. Wang, C., Song, P. & Niu, Y. The management of dementia worldwide: A review on policy practices, clinical guidelines, end-of-life care, and challenge along with aging population. *Biosci Trends* 16, 119–129 (2022).
4. Livingston, G. *et al.* Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *The Lancet Comissions* 396, 413–459 (2020).
5. Mukadam, N. *et al.* Changes in prevalence and incidence of dementia and risk factors for dementia: an analysis from cohort studies. *Lancet Public Health* 9, e443–e460 (2024).
6. Paradela, R. *et al.* Population attributable fractions for risk factors for dementia in seven Latin American countries: an analysis using cross-sectional survey data. *Lancet Glob Health* 12, e1600–e1610 (2024).
7. Qiu, C. & Fratiglioni, L. Aging without dementia is achievable: current evidence from epidemiological research. *Journal of Alzheimer's Disease* 62, 933–942 (2018).
8. dos Santos Picanco, L. C. *et al.* Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment. *Curr Med Chem* 25, 3141–3159 (2016).
9. Nyarko, J. *et al.* Profiles of β -amyloid peptides and key secretases in brain autopsy samples differ with sex and APOE ϵ 4 status: impact for risk and progression of Alzheimer. *Neuroscience* 373, 20–36 (2018).
10. Daham, R., Hazim, O. & Al-Hassany, M. A COMPREHENSIVE REVIEW OF ALZHEIMER'S DISEASE: PATHOGENESIS, RISK FACTORS, AND THERAPEUTIC APPROACHES. *Wourld Journal of Pharmaceutical Science and Research* 2, 99–111 (2023).
11. Dhana, K., Evans, D., Rajan, K., Bennett, D. & Morris, M. Healthy lifestyle and the risk of Alzheimer dementia: Findings from 2 longitudinal studies. *Neurology* 95, 374–383 (2020).
12. Livingston, G. *et al.* Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *The Lancet* 396, 413–446 (2020).
13. Du, X., Wang, X. & Geng, M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl Neurodegener* 7, (2018).
14. Armstrong, R. The Pathogenesis of Alzheimer' s Disease: A Reevaluation of the "Amyloid Cascade Hypothesis". *Int J Alzheimers Dis* 2011, (2011).

15. Rice, H. C. *et al.* Secreted amyloid- β precursor protein functions as a GABA B R1a ligand to modulate synaptic transmission. *Science (1979)* **363**, (2019).
16. Fu, L. *et al.* Comparison of neurotoxicity of different aggregated forms of A β 40, A β 42 and A β 43 in cell cultures. *Journal of Peptide Science* **23**, 245–251 (2017).
17. Qiu, T., Liu, Q., Chen, Y., Zhao, Y. & Li, Y. A β 42 and A β 40: similarities and differences. *Journal of Peptide Science* **21**, 522–529 (2015).
18. Orobets, K. & Karamyshec, A. Amyloid precursor protein and Alzheimer's disease. *mdpi.comKS Orobets, AL KaramyshevInternational journal of molecular sciences, 2023•mdpi.com* **24**, (2023).
19. Pfundstein, G., Nikonenko, A. & Sytnyk, V. Amyloid precursor protein (APP) and amyloid β (A β) interact with cell adhesion molecules: Implications in Alzheimer's disease and normal physiology. *Front Cell Dev Biol* **10**, (2022).
20. Li, L. *et al.* Hypoxia increases A β generation by altering β - and γ -cleavage of APP. *Neurobiol Aging* **30**, 1091–1098 (2009).
21. Tamagno, E. *et al.* Oxidative stress activates a positive feedback between the γ - and β -secretase cleavages of the β -amyloid precursor protein. *J Neurochem* **104**, 683–695 (2008).
22. Grimm, M. *et al.* Independent inhibition of Alzheimer disease β - and γ -secretase cleavage by lowered cholesterol levels. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 11302–11311 (2008).
23. Kepp, K. Bioinorganic chemistry of Alzheimer's disease. *Chem Rev* **112**, 5193–5239 (2012).
24. Bertram, L. & Tanzi, R. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat Rev Neurosci* **9**, 768–778 (2008).
25. Iulita, M., Chavez, D., Christensen, M., Tamayo, N. & Plana-Ripoll, O. Association of Alzheimer disease with life expectancy in people with Down syndrome. *JAMA Netw Open* **5**, (2022).
26. Pimplikar, S. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 1261–1268 (2009).
27. Bateman, R., Munsell, L., Morris, J. & Swarm, R. Human amyloid- β synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. *Nat Med* **12**, 856–861 (2006).
28. Lee, C. Y. D. & Landreth, G. E. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm* **117**, 949–960 (2010).
29. Mestre, H., Mori, Y. & Nedergaard, M. The Brain's Glymphatic System: Current Controversies. *Trends Neurosci* **43**, 458–466 (2020).

30. Ota, M. *et al.* Relationships between the Deposition of Amyloid- β and Tau Protein and Glymphatic System Activity in Alzheimer's Disease: Diffusion Tensor Image Study. *Journal of Alzheimer's Disease* **90**, 295–303 (2022).
31. Bell, R. *et al.* Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid β -peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **27**, 909–918 (2007).
32. Marais, A. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology* **51**, 165–176 (2019).
33. Wahrle, S. *et al.* ABCA1 is required for normal central nervous system ApoE levels and for lipidation of astrocyte-secreted apoE. *J Biol Chem* **279**, 40987–40993 (2004).
34. Hanson, A., Craft, S. & Banks, W. The APOE Genotype: Modification of Therapeutic Responses in Alzheimer's Disease. *Curr Pharm Des* **21**, 114–120 (2015).
35. Kok, E. *et al.* Apolipoprotein E-dependent accumulation of Alzheimer disease-related lesions begins in middle age. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological* **65**, 650–657 (2009).
36. Liu, C., Kanekiyo, T., Xu, H., Neurology, G. B.-N. R. & 2013, undefined. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol* **9**, 106–118 (2013).
37. Deane, R. *et al.* apoE isoform-specific disruption of amyloid β peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest* **118**, 4002–4013 (2008).
38. Long, H. *et al.* The Role of Microglia in Alzheimer's Disease From the Perspective of Immune Inflammation and Iron Metabolism. *Front Aging Neurosci* **14**, 888989 (2022).
39. Condello, C., Yuan, P. & Schain, A. Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar A β 42 hotspots around plaques. *Nat Commun* **6**, (2015).
40. Abud, E. *et al.* iPSC-derived human microglia-like cells to study neurological diseases. *Neuron* **94**, 278–293 (2017).
41. Shen, Y., Joachimiak, A., Rosner, M. & Tang, W. Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature* **443**, 870–874 (206AD).
42. Hersh, L. & Rodgers, D. Neprilysin and Amyloid Beta Peptide Degradation. *Curr Alzheimer Res* **5**, 225–231 (2008).
43. Merighi, S., Nigro, M., Travagli, A. & Gessi, S. Microglia and Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci* **23**, 12990 (2022).

44. Stewart, C. *et al.* CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* **11**, 155–161 (2010).
45. Cukalevski, R. *et al.* The A β 40 and A β 42 peptides self-assemble into separate homomolecular fibrils in binary mixtures but cross-react during primary nucleation. *Chem Sci* **6**, 4215–4233 (2015).
46. Thal, D., Walter, J., Saito, T. & Fändrich, M. Neuropathology and biochemistry of A β and its aggregates in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **129**, 167–182 (2015).
47. Serpell, L. Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **1502**, 16–30 (2000).
48. Camino, J., Gracia, P. & Cremades, N. The role of water in the primary nucleation of protein amyloid aggregation. *Biophys Chem* **269**, 106520 (2021).
49. Reddy, G., Straub, J. & Thirumalai, D. Dry amyloid fibril assembly in a yeast prion peptide is mediated by long-lived structures containing water wires. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 21459–21464 (2010).
50. Sengupta, U., Nilson, A. & Kaye, R. The role of amyloid- β oligomers in toxicity, propagation, and immunotherapy. *EBioMedicine* **6**, 42–49 (2016).
51. Petersen, R. *et al.* Mild cognitive impairment due to Alzheimer disease in the community. *Ann Neurol* **74**, 199–208 (2013).
52. Erten-Lyons, D. *et al.* Factors associated with resistance to dementia despite high Alzheimer disease pathology. *Neurology* **72**, 354–360 (2009).
53. Lesné S, Kotilinek, L. & Ashe, K. Plaque-bearing mice with reduced levels of oligomeric amyloid- β assemblies have intact memory function. *Neuroscience* **151**, 745–749 (2008).
54. Mroczko, B., Groblewska, M., Litman-Zawadzka, A., Kornhuber, J. & Lewczuk, P. Amyloid β oligomers (A β Os) in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* **125**, 177–191 (2018).
55. Viola, K. & Klein, W. Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol* **129**, 183–206 (2015).
56. Mroczko, B., Groblewska, M., Litman-Zawadzka, A., Kornhuber, J. & Lewczuk, P. Cellular receptors of amyloid β oligomers (A β Os) in Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci* **19**, 1884 (2018).
57. Panza, F., Lozupone, M., Logroscino, G. & Imbimbo, B. A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* **15**, 73–88 (2019).

58. Roda, A., Serra-Mir, G., Montoliu-Gaya, L., Tiessler, L. & Villegas, S. Amyloid-beta peptide and tau protein crosstalk in Alzheimer's disease. *Neural Regen Res* **17**, 1666–1674 (2022).
59. Mazanetz, M. & Fischer, P. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* **6**, 464–479 (2007).
60. Hampel, H. *et al.* The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Molecular Psychiatry* **26**, 5481–5503 (2021).
61. Rawat, P. *et al.* Phosphorylated Tau in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies. *Int J Mol Sci* **23**, 12841 (2022).
62. Bloom, G. Amyloid- β and Tau: The Trigger and Bullet in Alzheimer Disease Pathogenesis. *JAMA Neurol* **71**, 505–508 (2014).
63. Götz, J., Chen, F., Van Dorpe, J. & Nitsch, R. Formation of Neurofibrillary Tangles in P301L Tau Transgenic Mice Induced by A β 42 Fibrils. *Science (1979)* **293**, 1491–1495 (2001).
64. Zeng, F. & Goodman, M. Fluorine-18 Radiolabeled Heterocycles as PET Tracers for Imaging β -Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. *Curr Top Med Chem* **13**, 909–919 (2013).
65. Habashi, M. *et al.* Early diagnosis and treatment of Alzheimer's disease by targeting toxic soluble A β oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **119**, (2022).
66. Jie, C., Treyer, V., Schibli, R. & Mu, L. Tauvid™: The First FDA-Approved PET Tracer for Imaging Tau Pathology in Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals* **14**, 110 (2021).
67. van Oostveen, W. & de Lange, E. Imaging Techniques in Alzheimer's Disease: A Review of Applications in Early Diagnosis and Longitudinal Monitoring. *Int J Mol Sci* **22**, 2110 (2021).
68. Mahaman, Y. *et al.* Biomarkers used in Alzheimer's disease diagnosis, treatment, and prevention. *Ageing Res Rev* **74**, 101544 (2022).
69. Zipser, B. *et al.* Microvascular injury and blood–brain barrier leakage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **28**, 977–986 (2007).
70. Leuzy, A. *et al.* Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* **14**, (2022).
71. Grigoli, M., Pelegrini, L., Whelan, R. & Cominetti, M. Present and Future of Blood-Based Biomarkers of Alzheimer's Disease: Beyond the Classics. *Brain Res* **1830**, 148812 (2024).
72. Lehmann, S. *et al.* Relevance of A β 42/40 ratio for detection of Alzheimer disease pathology in clinical routine: The PLMR scale. *Front Aging Neurosci* **10**, 325959 (2018).

73. Ovod, V. *et al.* Amyloid β concentrations and stable isotope labeling kinetics of human plasma specific to central nervous system amyloidosis. *Alzheimer's & Dementia* **13**, 841–849 (2017).
74. Suarez-Calvet, M. *et al.* Novel tau biomarkers phosphorylated at T181, T217 or T231 rise in the initial stages of the preclinical Alzheimer's continuum when only subtle changes in A β pathology are detected. *EMBO Mol Med* **12**, 12921 (2020).
75. Janelidze, S. *et al.* Plasma P-tau181 in Alzheimer's disease: relationship to other biomarkers, differential diagnosis, neuropathology and longitudinal progression to Alzheimer's dementia. *Nature Medicine* **26**, 379–386 (2020).
76. Bellaver, B. *et al.* Astrocyte reactivity influences amyloid- β effects on tau pathology in preclinical Alzheimer's disease. *Nature Medicine* **29**, 1775–1781 (2023).
77. Mattsson-Carlsson, N. *et al.* Soluble P-tau217 reflects amyloid and tau pathology and mediates the association of amyloid with tau. *EMBO Mol Med* **13**, 14022 (2021).
78. Cullen, N. *et al.* Test-retest variability of plasma biomarkers in Alzheimer's disease and its effects on clinical prediction models. *Alzheimer's & Dementia* **19**, 797–806 (2023).
79. Huang, Y., Huang, C., Zhang, Q., Shen, T. & Sun, J. Serum NFL discriminates Parkinson disease from essential tremor and reflect motor and cognition severity. *BMC Neurol* **22**, 1–8 (2022).
80. Hall, J. *et al.* Relationship of Neurofilament Light (NfL) and Cognitive Performance in a Sample of Mexican Americans with Normal Cognition, Mild Cognitive Impairment and Dementia. *Curr Alzheimer Res* **17**, 1214–1220 (2021).
81. Kim, K., Shin, K. & Chang, K. GFAP as a Potential Biomarker for Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cells* **12**, 1309 (2023).
82. Abdelhak, A. *et al.* Blood GFAP as an emerging biomarker in brain and spinal cord disorders. *Nature Reviews Neurology* **18**, 158–172 (2022).
83. Chatterjee, P. *et al.* Plasma glial fibrillary acidic protein is elevated in cognitively normal older adults at risk of Alzheimer's disease. *Translational Psychiatry* **11**, 1–10 (2021).
84. Guan, Z. Cross-talk between oxidative stress and modifications of cholinergic and glutaminergic receptors in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Acta Pharmacologica Sinica* **29**, 773–780 (2008).
85. Bores, G. *et al.* Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine. *J Pharmacol Exp Ther* **277**, 728–738 (1996).

86. Amici, S. *et al.* Cerebrospinal fluid acetylcholinesterase activity after long-term treatment with donepezil and rivastigmina. *Mech Ageing Dev* **122**, 2057–2062 (2001).
87. Adlimoghaddam, A., Neuendorff, M., Roy, B. & Albeni, B. A review of clinical treatment considerations of donepezil in severe Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther* **24**, 876–888 (2018).
88. Colovic, M., Krstic, D., Lazarevic-Pasti, T., Bondzic, A. & Vasic, V. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr Neuropharmacol* **11**, 315–335 (2013).
89. Lipton, S. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery* **5**, 160–170 (2006).
90. Vaz, M., Silva, V., Monteiro, C. & Silvestre, S. Role of Aducanumab in the Treatment of Alzheimer's Disease: Challenges and Opportunities. *Clin Interv Aging* **17**, 797–810 (2022).
91. Rashad, A. *et al.* Donanemab for Alzheimer's Disease: A Systematic Review of Clinical Trials. *Healthcare (Switzerland)* **11**, 32 (2023).
92. Valenzuela, M. & Pascual-Leone, A. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* **388**, 1630 (2023).
93. Daly, T., Kepp, K. & Imbimbo, B. Are lecanemab and donanemab disease-modifying therapies? *Alzheimer's & Dementia* **20**, 6659 (2024).
94. Ji, S. & Rosenbloom, M. Intracerebral hemorrhage following mild ARIA-H in an APOE ϵ 2 carrier receiving lecanemab. *Alzheimer's Research and Therapy* **16**, 1–3 (2024).
95. Bolognesi, M., Gandini, A., Prati, F. & Uliassi, E. From Companion Diagnostics to Theranostics: A New Avenue for Alzheimer's Disease? *J Med Chem* **59**, 7759–7770 (2016).
96. Sarabia-Vallejo, Á., López-Alvarado, P. & Menéndez, J. Small-molecule theranostics in Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem* **255**, 115382 (2023).
97. Rosenberg, B., VanCamp, L., Trosko, J. E. & Mansour, V. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature* 1969 222:5191 **222**, 385–386 (1969).
98. Wang, X., Wang, X. & Guo, Z. Metal-involved theranostics: An emerging strategy for fighting Alzheimer's disease. *Coord Chem Rev* **362**, 72–84 (2018).
99. Man, B. *et al.* Group 9 metal-based inhibitors of β -amyloid (1-40) fibrillation as potential therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Chem Sci* **2**, 917–921 (2011).
100. Balzani, V., Ceroni, P. & Juris Photochemistry, A. *Photochemistry and Photophysics: Concepts, Research, Applications.* (2014).

101. Frei, A. *et al.* Synthesis, characterization, and biological evaluation of new Ru(II) polypyridyl photosensitizers for photodynamic therapy. *J Med Chem* **57**, 7280–7292 (2014).
102. Cook, N., Ozbil, M., Katsampes, C., Prabhakar, R. & Marti, A. Unraveling the photoluminescence response of light-switching ruthenium(II) complexes bound to amyloid- β . *J Am Chem Soc* **135**, 10810–10816 (2013).
103. Valensin, D. *et al.* Fac- $\{Ru(CO)_3\}^{2+}$ Selectively Targets the Histidine Residues of the β -Amyloid Peptide 1-28. Implications for New Alzheimer's Disease Treatments Based on Ruthenium Complexes. *Inorg Chem* **49**, 4720–4722 (2010).
104. Gomes, L., Bataglioli, J. & Storr, T. Metal complexes that bind to the amyloid- β peptide of relevance to Alzheimer's disease. *Coord Chem Rev* **412**, 213255 (2020).
105. Son, G., Lee, B., Chung, Y. & Park, C. Light-triggered dissociation of self-assembled β -amyloid aggregates into small, nontoxic fragments by ruthenium (II) complex. *Acta Biomater* **67**, 147–155 (2018).
106. Vyas, N. *et al.* Ruthenium(II) polypyridyl complex as inhibitor of acetylcholinesterase and A β aggregation. *Eur J Med Chem* **75**, 375–381 (2014).
107. Liu, Y., Ma, J., Zhang, Q., Wang, Y. & Sun, Q. Mechanism of Metal Complexes in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* **25**, 11873 (2024).
108. Thota, S., Rodrigues, D., Crans, D. & Barreiro, E. Ru(II) Compounds: Next-Generation Anticancer Metallotherapeutics? *J Med Chem* **61**, 5805–5821 (2018).
109. Alessio, E. & Messori, L. NAMI-A and KP1019/1339, Two Iconic Ruthenium Anticancer Drug Candidates Face-to-Face: A Case Story in Medicinal Inorganic Chemistry. *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 1995 **24**, 1995 (2019).
110. Wirtz, P. *et al.* Efficacy of 3,4-Diaminopyridine and Pyridostigmine in the Treatment of Lambert–Eaton Myasthenic Syndrome: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Study. *Clin Pharmacol Ther* **86**, 44–48 (2009).
111. Zhang, N. *et al.* 3,4-diaminopyridine treatment for Lambert-Eaton myasthenic syndrome in adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Neurol* **21**, 1–9 (2021).
112. Jensen, H., Ravnborg, M., Dalgas, U. & Stenager, E. 4-Aminopyridine for symptomatic treatment of multiple sclerosis: a systematic review. *Ther Adv Neurol Disord* **7**, 97 (2014).
113. Bonnet, S. Ruthenium-Based Photoactivated Chemotherapy. *J Am Chem Soc* **145**, 23397–23415 (2023).

114. Siraj, S. *et al.* Interaction of Thioflavin T (ThT) and 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS) with macromolecular crowding agents and their monomers: Biophysical analysis using in vitro and computational approaches. *J Mol Liq* **374**, 121270 (2023).
115. Sulatskaya, A., Sulatsky, M., Povarova, O., Kuznetsova, I. & Turoverov, K. Ans Fluorescent Probe Induces Clustering of Amyloid Fibers. *Biophys J* **120**, 23a (2021).
116. Sulatsky, M. *et al.* Effect of the fluorescent probes ThT and ANS on the mature amyloid fibrils. *Prion* **14**, 67–75 (2020).
117. Chiti, F. & Dobson, C. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: A summary of progress over the last decade. *Annu Rev Biochem* **86**, 27–68 (2017).
118. Ge, W. *et al.* Amyloid Protein Cross-Seeding Provides a New Perspective on Multiple Diseases In Vivo. *Biomacromolecules* **24**, 1–18 (2023).
119. Ivanova, M., Lin, Y., Lee, Y., Zheng, J. & Ramamoorthy, A. Biophysical processes underlying cross-seeding in amyloid aggregation and implications in amyloid pathology. *Biophys Chem* **269**, 106507 (2021).
120. Subedi, S., Sasidharan, S., Nag, N., Saudagar, P. & Tripathi, T. Amyloid Cross-Seeding: Mechanism, Implication, and Inhibition. *Molecules* **27**, 1776 (2022).
121. Brender, J., Salamekh, S. & Ramamoorthy, A. Membrane disruption and early events in the aggregation of the diabetes related peptide IAPP from a molecular perspective. *Acc Chem Res* **45**, 454–462 (2012).
122. Saeedi, P. *et al.* Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract* **157**, 107843 (2019).
123. Carranza-naval, M. *et al.* Alzheimer's Disease and Diabetes: Role of Diet, Microbiota and Inflammation in Preclinical Models. *Biomolecules* **11**, 262 (2021).
124. Domínguez, R. *et al.* Alzheimer disease and cognitive impairment associated with diabetes mellitus type 2: associations and a hypothesis. *Neurología (English Edition)* **29**, 567–572 (2014).
125. Luchsinger, J. Diabetes, related conditions, and dementia. *J Neurol Sci* **299**, 35–38 (2010).
126. Sankar, S. *et al.* Amyloid beta and diabetic pathology cooperatively stimulate cytokine expression in an Alzheimer's mouse model. *J Neuroinflammation* **17**, 1–15 (2020).
127. Zhao, W. & Townsend, M. Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease.

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1792**, 482–496 (2009).
128. Biessels, G., Staekenborg, S., Brunner, E., Brayne, C. & Scheltens, P. Risk of dementia in diabetes mellitus: A systematic review. *Lancet Neurology* **5**, 64–74 (2006).
 129. Craft, S. The Role of Metabolic Disorders in Alzheimer Disease and Vascular Dementia: Two Roads Converged. *Arch Neurol* **66**, 300–305 (2009).
 130. Watson, G. *et al.* Insulin increases CSF A β 42 levels in normal older adults. *Neurology* **60**, 1899–1903 (2003).
 131. Infante-Garcia, C. *et al.* Antidiabetic Polypill Improves Central Pathology and Cognitive Impairment in a Mixed Model of Alzheimer’s Disease and Type 2 Diabetes. *Mol Neurobiol* **55**, 6130–6144 (2018).
 132. Soto, C. & Pritzkow, S. Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* **21**, 1332–1340 (2018).
 133. O’Nuallain, B., Williams, A., Westermarck, P. & Wetzel, R. Seeding Specificity in Amyloid Growth Induced by Heterologous Fibrils. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 17490–17499 (2004).
 134. De Felice, F. *et al.* Protection of synapses against Alzheimer’s-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of A β oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1971–1976 (2009).
 135. S. Roriz-Filho, J. *et al.* (Pre)diabetes, brain aging, and cognition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1792**, 432–443 (2009).
 136. Luchsinger, J., Tang, M., Stern, Y., Shea, S. & Mayeux, R. Diabetes Mellitus and Risk of Alzheimer’s Disease and Dementia with Stroke in a Multiethnic Cohort. *Am J Epidemiol* **154**, 635–641 (2001).
 137. Takeda, S., Sato, N., Rakugi, H. & Morishita, R. Molecular mechanisms linking diabetes mellitus and Alzheimer disease: beta-amyloid peptide, insulin signaling, and neuronal function. *Mol Biosyst* **7**, 1822–1827 (2011).
 138. Luo, J., Wärmländer, S., Gräslund, A. & Abrahams, J. Reciprocal Molecular Interactions between the A β Peptide Linked to Alzheimer’s Disease and Insulin Linked to Diabetes Mellitus Type II. *ACS Chem Neurosci* **7**, 269–274 (2016).
 139. Silva, D. *et al.* Luminescent Ru(II) Phenanthroline Complexes as a Probe for Real-Time Imaging of A β Self-Aggregation and Therapeutic Applications in Alzheimer’s Disease. *J Med Chem* **59**, 9215–9227 (2016).
 140. Cali, M. *et al.* Comparison of A β (1–40, 1–28, 11–22, and 29–40) aggregation processes and inhibition of toxic species generated in early stages of aggregation by a water-soluble ruthenium complex. *J Inorg Biochem* **215**, 111314 (2021).

141. Camilo, M., Cardoso, C., Carlos, R. & Lever, A. Photosolvolytic of cis -[Ru(α -diimine)₂(4-aminopyridine)₂]²⁺ complexes: Photophysical, spectroscopic, and density functional theory analysis. *Inorg Chem* **53**, 3694–3708 (2014).
142. McInnes, L. *et al.* Potential Diagnostic Imaging of Alzheimer's Disease with Copper-64 Complexes That Bind to Amyloid- β Plaques. *Inorg Chem* **58**, 3382–3395 (2019).
143. Shimizu, O. & Imakubo, K. NEW EMISSION BAND OF TYROSINE INDUCED BY INTERACTION WITH PHOSPHATE ION. *Photochem Photobiol* **26**, 541–543 (1977).
144. Szabo, A., Lynn, K., Krajcarski, D. & Rayner, D. Tyrosinate fluorescence maxima at 345 nm in proteins lacking tryptophan at pH 7. *FEBS Lett* **94**, 249–252 (1978).
145. Singh, A., Khatun, S. & Nath Gupta, A. Simultaneous Detection of Tyrosine and Structure-Specific Intrinsic Fluorescence in the Fibrillation of Alzheimer's Associated Peptides. *ChemPhysChem* **21**, 2585–2598 (2020).
146. Aran Terol, P., Kumita, J., Hook, S., Dobson, C. & Esbjörner, E. Solvent exposure of Tyr10 as a probe of structural differences between monomeric and aggregated forms of the amyloid- β peptide. *Biochem Biophys Res Commun* **468**, 696 (2015).
147. Subedi, S., Sasidharan, S., Nag, N., Saudagar, P. & Tripathi, T. Amyloid Cross-Seeding: Mechanism, Implication, and Inhibition. *Molecules* **27**, 1776 (2022).
148. Luo, J., Wärmländer, S., Gräslund, A. & Abrahams, J. Cross-interactions between the Alzheimer Disease Amyloid- β Peptide and Other Amyloid Proteins: A Further Aspect of the Amyloid Cascade Hypothesis. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 16485–16493 (2016).
149. Luo, J., Wärmländer, S., Gräslund, A. & Abrahams, J. Reciprocal Molecular Interactions between the A β Peptide Linked to Alzheimer's Disease and Insulin Linked to Diabetes Mellitus Type II. *ACS Chem Neurosci* **7**, 269–274 (2016).
150. Long, K., Williams, T. & Urbanc, B. Insulin Inhibits A β 42 Aggregation and Prevents A β 42-Induced Membrane Disruption. *Biochemistry* **58**, 4519–4529 (2019).
151. Du, Z. *et al.* Cross-fibrillation of insulin and amyloid β on chiral surfaces: Chirality affects aggregation kinetics and cytotoxicity. *Nano Res* **11**, 4102–4110 (2018).
152. Garcia-Alloza, M. *et al.* Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* **24**, 516–524 (2006).

153. Jankowsky, J. *et al.* APP processing and amyloid deposition in mice haplo-insufficient for presenilin 1. *Neurobiol Aging* **25**, 885–892 (2004).
154. Jankowsky, J. *et al.* Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. *Hum Mol Genet* **13**, 159–170 (2004).
155. Hierro-Bujalance, C., Bacskai, B. & Garcia-Alloza, M. In Vivo imaging of microglia with multiphoton microscopy. *Front Aging Neurosci* **10**, 379872 (2018).
156. Srinivasan, T. & Yildirim, M. Advances in Ultrafast Fiber Lasers for Multiphoton Microscopy in Neuroscience. *Photonics* **10**, 1307 (2023).
157. Liebscher, S. & Meyer-Luehmann, M. A peephole into the brain: Neuropathological features of Alzheimer's disease revealed by in vivo two-photon imaging. *Front Psychiatry* **3**, 21738 (2012).
158. Xu, C., Nedergaard, M., Fowell, D., Friedl, P. & Ji, N. Multiphoton fluorescence microscopy for in vivo imaging. *Cell* **187**, 4458–4487 (2024).
159. Kobaisi, M., Bhosale, S., Latham, K., Raynor, A. & Bhosale, S. Functional Naphthalene Diimides: Synthesis, Properties, and Applications. *Chem Rev* **116**, 11685–11796 (2016).
160. Liu, C. *et al.* Visualization of the elevated levels of hypochlorous acid in Alzheimer's disease with a ruthenium(II) complex-based luminescence probe. *Anal Chim Acta* **1279**, 341779 (2023).
161. Liu, Y., Chen, Y., Gong, Y., Yang, H. & Liu, J. Polydopamine/Ruthenium Nanoparticle Systems as Photothermal Therapy Reagents and Reactive Oxygen Species Scavengers for Alzheimer's Disease Treatment. *ACS Appl Nano Mater* **6**, 5384–5393 (2023).
162. Zhou, H. *et al.* Intelligently thermoresponsive flower-like hollow nano-ruthenium system for sustained release of nerve growth factor to inhibit hyperphosphorylation of tau and neuronal damage for the treatment of Alzheimer's disease. *Biomaterials* **237**, 119822 (2020).
163. Nikseresht, Z., Ahangar, N., Badrikoohi, M. & Babaei, P. Synergistic enhancing-memory effect of D-serine and RU360, a mitochondrial calcium uniporter blocker in rat model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research* **409**, 113307 (2021).
164. Tang, R. *et al.* Ruthenium Dioxide Nanoparticles Treat Alzheimer's Disease by Inhibiting Oxidative Stress and Alleviating Neuroinflammation. *ACS Appl Nano Mater* **6**, 11661–11678 (2023).
165. Sharma, Y. & Garabadu, D. Ruthenium red, mitochondrial calcium uniporter inhibitor, attenuates cognitive deficits in STZ-ICV challenged experimental animals. *Brain Res Bull* **164**, 121–135 (2020).

