

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO
DOUTORADO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO



Tese

**POTENCIAL NEUROPROTETOR DO ÁCIDO TÂNICO EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DEMÊNCIA ESPORÁDICA DO TIPO ALZHEIMER**

Mariana Freire Barbieri Gerzson

Pelotas, 2019

Mariana Freire Barbieri Gerzson

**POTENCIAL NEUROPROTETOR DO ÁCIDO TÂNICO EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DEMÊNCIA ESPORÁDICA DO TIPO ALZHEIMER**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Francieli Moro Stefanello
Co-orientadora: Prof. Dr^a. Roselia Maria Spanevello

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G354p Gerzson, Mariana Freire Barbieri

Potencial neuroprotetor do ácido tânico em modelo experimental de demência esporádica do tipo alzheimer / Mariana Freire Barbieri Gerzson ; Francieli Moro Stefanello, orientadora ; Roselia Maria Spanevello, coorientadora. — Pelotas, 2019.

101 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Ácido tânico. 2. Estreptozotocina. 3. Doença de alzheimer. 4. Produto natural. 5. Neuroproteção. I. Stefanello, Francieli Moro, orient. II. Spanevello, Roselia Maria, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

Elaborada por Dafne Silva de Freitas CRB: 10/2175

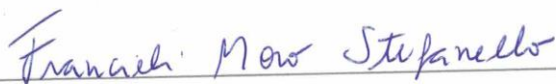
Mariana Freire Barbieri Gerzson

POTENCIAL NEUROPROTETOR DO ÁCIDO TÂNICO EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DEMÊNCIA ESPORÁDICA DO TIPO ALZHEIMER

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

Data da Defesa: 30 de agosto de 2019

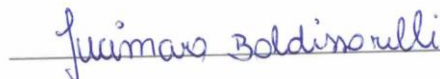
Banca examinadora:



Profª Drª Francieli Moro Stefanello (Orientadora) - Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



Profª Drª Izabel Cristina Custodio de Souza - Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



Profª Drª Jucimara Baldissarelli - Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria.



Profª Drª Ana Paula Pesarico - Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria.

Dedico este trabalho a todas as pessoas com Doença de Alzheimer.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre me iluminar, guiar meus passos e me permitir alcançar esta vitória.

Agradeço especialmente às minhas filhas Luísa e Martina por suportar minha ausência para que fosse possível a realização deste trabalho. Ao meu marido, Márcio, agradeço pelas incansáveis palavras de força, pela doação, companheirismo, carinho, amor, por aguentar minhas agonias e desesperos e também por compartilhar as felicidades e por ter sido incansável pai durante a minha ausência.

À toda minha família pelo incentivo e por vibrarem com minhas vitórias. Agradeço especialmente aos meus pais e avós que me proporcionaram o estudo para que eu pudesse chegar até aqui.

Agradeço imensamente a minha rede de apoio, minhas funcionárias, meus sogros e especialmente à minha tia Virgínia e minha prima Maria por cuidarem das minhas filhas sempre que precisei de ajuda. A essas últimas agradeço ainda por me emprestarem a casa para eu concluir a escrita dessa tese sem interrupções pelos chorinhos da Martina.

À minha orientadora Francieli, exemplo de profissional, sempre correta e justa, agradeço por acreditar em minha capacidade e me ajudar a conquistar meu objetivo. Agradeço também pela paciência em momentos difíceis e pela amizade fora do laboratório. Obrigada por me guiar neste aprendizado.

À professora Roselia pela co-orientação. Sempre disponível e alegre, obrigada pelo exemplo profissional e pela amizade.

As minhas amigas e colegas de laboratório especialmente à Mayara, Natália, Simone, Pathise, Juliana, Elita e Fernanda por me ajudarem no trabalho e tornarem a rotina diária muito mais alegre e divertida, por podermos rir juntas dos nossos erros e aprender com eles. Agradeço, ainda, pela

amizade além dos limites do laboratório e pelo bom humor frequente, mesmo em situações difíceis. Vocês foram fundamentais durante os altos e baixos que se alternaram nesse período.

A todos os colegas dos laboratórios NEUROCAN e BIOMARCADORES, pela ajuda e pelos momentos divertidos que passamos juntos no dia a dia, tornando a rotina mais prazerosa.

Agradeço também aos laboratórios parceiros neste trabalho: Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular (UFRGS), Laboratório de Pesquisa em Patologia (UFCSPA) e Laboratório de Biologia Molecular (UFG).

Aos funcionários do biotério da Universidade Federal de Pelotas, obrigada pelos conhecimentos práticos repassados, incentivo, convivência, disponibilidade e amizade.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção pelos ensinamentos.

Agradeço, enfim, à Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade, e a CAPES pelo auxílio financeiro.

Obrigada!

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

Resumo

GERZSON, Mariana Freire Barbieri. **Potencial neuroprotetor do ácido tânico em modelo experimental de demência esporádica do tipo Alzheimer**. 2019. 101f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa isenta de uma farmacoterapia capaz de reverter o processo neurodegenerativo uma vez instalado. Nesse sentido o uso de estratégias preventivas torna-se relevante. Alguns compostos polifenólicos já demonstraram influenciar positivamente a patologia da DA, sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar a capacidade do ácido tânico (AT) em prevenir déficits de memória e alterações neuroquímicas induzidas pela administração intracerebroventricular (icv) de estreptozotocina (STZ) em um modelo de Demência Esporádica do Tipo Alzheimer (SDAT) em ratos. Ratos machos Wistar com 60 dias foram divididos em quatro grupos: controle, AT, STZ e AT+STZ. Os animais dos grupos AT e AT+STZ foram tratados por gavagem com AT (30 mg/kg) por 21 dias, enquanto os outros grupos receberam veículo (água). No 22º dia os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica. Os grupos STZ e AT+STZ receberam uma injeção icv bilateral de STZ (3 mg/kg) e os outros grupos receberam veículo (tampão citrato). Após a recuperação da cirurgia, o tratamento por via oral foi reestabelecido e os animais foram avaliados nos testes comportamentais : labirinto em Y, reconhecimento de objetos e esquiva inibitória. Após, os animais foram eutanasiados por decapitação, o córtex cerebral e hipocampo foram utilizados para as análises bioquímicas, histológicas e moleculares. A STZ induziu prejuízo no aprendizado e na memória nos testes de reconhecimento de objetos, labirinto em Y e esquiva inibitória; no entanto, o tratamento com AT foi capaz de prevenir esses efeitos. No córtex cerebral e no hipocampo, STZ induziu um aumento na atividade da acetilcolinesterase, reduziu a atividade da Na^+, K^+ -ATPase e induziu estresse oxidativo aumentando as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, nitritos e espécies reativas de oxigênio e reduzindo a atividade de enzimas antioxidantes, enquanto o tratamento com AT foi capaz de prevenir a maioria dessas alterações neuroquímicas. Sobrevivência neuronal, neuroinflamação, expressão do marcador de neurodegeneração SNAP-25 e modulação da via de sinalização PI3K-Akt foram avaliados no córtex cerebral. A STZ promoveu aumento na morte neuronal e nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e $\text{TNF-}\alpha$), além de uma diminuição na sinalização PI3K-Akt; o AT foi efetivo em prevenir essas mudanças. Tanto a STZ quanto o AT não alteraram a expressão de SNAP-25 nem os níveis de IL-12 e IL-4 no córtex cerebral. Em conclusão, o AT preveniu déficit de memória, alterações nas atividades de enzimas cerebrais, dano oxidativo, alteração na sinalização PI3K-Akt e protegeu contra a morte neuronal e neuroinflamação em SDAT induzido por STZ em ratos, demonstrando ser um potencial agente terapêutico na prevenção da Doença Esporádica de Alzheimer.

Palavras chave: Ácido Tânico. Doença de Alzheimer. Produto Natural. Estreptozotocina. Neuroproteção.

Abstract

GERZSON, Mariana Freire Barbieri. **Neuroprotective potential of tannic acid in an experimental model of Sporadic Dementia of Alzheimer's Type**. 2019. 101f. Thesis (Doctorate) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disease without pharmacotherapy capable of reversing the neurodegenerative process once installed. In this sense the use of preventive strategies becomes relevant. Some polyphenolic compounds have been shown to positively influence the pathology of AD, so the aim of this study was to investigate the ability of tannic acid (TA) to prevent memory deficits and neurochemical alterations induced by intracerebroventricular (icv) administration of streptozotocin (STZ) in a model of Sporadic Dementia of Alzheimer's Type (SDAT) in rats. Male Wistar rats, 60 day-old were divided into four groups: control, TA, STZ, and TA+STZ. Animals of TA and TA+STZ groups were treated by gavage with TA (30 mg/kg, b.w.) *per* 21 days and the others groups received vehicle (water). At the 22th day animals were submitted to stereotaxic surgery. The STZ and TA+STZ groups received bilateral *icv* injection of 5 μ L of STZ (3 mg/kg, b.w.) and others received vehicle (citrate buffer). After recovery (3 days), treatment was reestablished and animals were evaluated in behavioral tests: Y-maze, object recognition and inhibitory avoidance task. Next, the animals were euthanized by decapitation and the cerebral cortex and hippocampus were used for biochemical, histological and molecular analysis. STZ induced learning and memory impairments in object recognition, Y-maze and inhibitory avoidance tests; however, TA was able to prevent these effects. In cerebral cortex and hippocampus, STZ induced an increase in acetylcholinesterase activity, reduced Na⁺,K⁺-ATPase activity and induced oxidative stress increasing thiobarbituric acid-reactive substances, nitrites and reactive oxygen species levels and reducing the activity of antioxidant enzymes. Treatment with TA was able in prevent the major of these neurochemical alterations. Neuronal survival, neuroinflammation, expression of neurodegeneration marker SNAP-25 and modulation of the PI3K/Akt signaling pathway in the cerebral cortex were all evaluated. STZ promoted increase in neuronal death and in the levels of proinflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α), and a reduction in PI3K-Akt signaling; TA was able to restore these changes. Neither STZ nor TA altered SNAP-25 expression or the levels of IL-12 and IL-4 in the cerebral cortex. In conclusion, TA prevented memory deficit, alterations in brain enzyme activities, oxidative damage, impaired PI3K-Akt signaling and protected against neuronal death and neuroinflammation in STZ-induced SDAT in rats proving to be potential therapeutic agents in the prevention of Sporadic Alzheimer's Disease.

Key words: Tannic Acid. Alzheimer's Disease. Natural Product. Streptozotocin. Neuroprotection.

Lista de Figuras

Figura 1	Mecanismos envolvidos na patogênese da DA	20
Figura 2	Fatores de risco genéticos e ambientais contribuem para o desenvolvimento da Doença de Alzheimer Esporádica	24
Figura 3	Mecanismos de ativação/desativação que modulam a via de sinalização PI3K/Akt.....	27
Figura 4	Estrutura química do Ácido Tânico	32

Lista de abreviaturas e fórmulas químicas

AChE - Acetilcolinesterase

Akt - Proteína cinase B neuronal

ApoE4 - Apo E alelo $\epsilon 4$

APP - Proteína precursora amiloide

AT - Ácido tânico

A β - Peptídeo β -amiloide

CAT - Catalase

DA - Doença de Alzheimer

DAE - Doença de Alzheimer Esporádica

DAF - Doença de Alzheimer Familiar

DNA-PK - Proteína cinase dependente de DNA

ER - Espécies reativas

ERN - Espécies reativas de nitrogênio

ERO - Espécies reativas de oxigênio

FOXO - Fator de transcrição FOXO

GPx - Glutathione peroxidase

GSK3 β - Glicogênio sintase cinase 3 β

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

icv - Intracerebroventricular

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IGF-1R - Receptor de IGF-1

IL - 1β - Interleucina 1β

IL-12 - Interleucina 12

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

IRS - Receptor de insulina

mTORC1 - Alvo da rapamicina-1 em mamífero

mTORC2 - Alvo da rapamicina-2 em mamífero

NKA - Na^+, K^+ -ATPase

NFT - Emaranhados neurofibrilares

NO - Óxido nítrico

$\text{O}_2^{\cdot -}$ - Radical ânion superóxido

$\text{OH}^{\cdot}$ - Radical hidroxil

$\text{ONOO}^{\cdot -}$ - Peroxinitrito

pAkt - Proteína cinase B neuronal fosforilada

PKD-1 - Proteína cinase-1 dependente de fosfatidilinositol

PHLPPs - Proteínas fosfatases com domínio rico em leucina

PI3K - Fosfatidilinositol 3-cinase

PP2A - Proteína fosfatase 2A

PS1 - Presenilina 1

PS2 - Presenilina 2

PTEN - Fosfatase homóloga à tensina deletada no cromossomo 10

RI - Resistência à insulina

SH - Grupos sulfidrilas

SOD - Superóxido dismutase

SDAT - Demência Esporádica do Tipo Alzheimer

STZ - Estreptozotocina

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TNFR1 ou p55 - Receptor do TNF tipo 1

TNFR2 ou p75 - Receptor do TNF tipo 2

Sumário

1 Introdução	14
2 Objetivos	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 Revisão da Literatura	18
Doença de Alzheimer	18
Estresse Oxidativo na Doença de Alzheimer.	21
Alterações na via de sinalização PI3K-Akt na Doença de Alzheimer	25
Neuroinflamação e a Doença de Alzheimer	28
Modelo de Demência Esporádica do Tipo Alzheimer induzido por estreptozotocina	30
Ácido Tânico	31
4. Artigo	34
5. Manuscrito	60
6. Considerações Finais	85
Referências	87
Anexo	100

1. Introdução

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa altamente incapacitante e que atinge cerca de 35 milhões de pessoas no mundo (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2016; ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2017). Pode ser herdada geneticamente, sendo conhecida como Doença de Alzheimer Familiar (DAF) ou ter etiologia multifatorial, sendo denominada de Doença de Alzheimer Esporádica (DAE). A DAE atinge pacientes com idade avançada e representa 90 % dos casos da doença (CAUWENBERGHE; BROECKHOVEN; SLEEGERS, 2016).

Nos cérebros de pacientes com a DA há um acúmulo de peptídeos β -amiloides ($A\beta$) os quais se agregam formando placas senis insolúveis e a presença de emaranhados neurofibrilares (NFT), considerados características histopatológicas da doença (KUMAR & EKAVALI, 2015). Perda neuronal e sináptica, ativação da glia e inflamação, assim como a presença de estresse oxidativo e alterações na via de sinalização fosfatidilinositol 3-cinase - proteína cinase B neuronal (PI3K-Akt) e na atividade de algumas enzimas como acetilcolinesterase (AChE) e Na^+, K^+ -ATPase (NKA) também estão presentes nas regiões cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas, incluindo o córtex cerebral e hipocampo de pacientes com DA (KUMAR; EKAVALI, 2015).

Desde 1906, após a descoberta da doença por Alois Alzheimer, diversas hipóteses tentam explicar os mecanismos envolvidos nessa patologia. Na hipótese da glicodeprivação cerebral, o hipometabolismo da glicose cerebral tem sido proposto como um evento inicial e persistente envolvido na instalação e na progressão da DA. A injeção de estreptozotocina (STZ) intracerebroventricular (icv) diminui a captação cerebral de glicose e produz múltiplos outros efeitos que se assemelham a aspectos moleculares, patológicos e comportamentais características da DA. Portanto tem sido bastante aceito como um modelo não transgênico da doença, mimetizando de forma mais fiel os aspectos envolvidos na DAE, sendo utilizado para testes pré-clínicos de terapias para esta patologia (KUMAR & EKAVALI, 2015).

Embora diversos estudos já tenham elucidado muitos mecanismos envolvidos na patofisiologia da DA algumas lacunas ainda permanecem, o que

impossibilita o desenvolvimento de terapias eficazes (KUMAR & DOGRA, 2008; GRIEB, 2016). Atualmente os tratamentos aprovados pela U.S. Food and Drug Administration (FDA), incluem cinco medicamentos usados para tratar as manifestações cognitivas da doença (KUMAR & EKAVALI, 2015). Embora atuem por mecanismos diferentes, todos tem como objetivo manter os níveis adequados de acetilcolina no cérebro, neurotransmissor essencial nos processos de memória e cognição (KUMAR & EKAVALI, 2015). Tais tratamentos reduzem modestamente a progressão dos sintomas cognitivos e comportamentais associados à doença em algumas pessoas, mas pelo menos metade dos pacientes não respondem ao tratamento (AULD et al., 2002).

Tendo em vista que nenhuma farmacoterapia atual é capaz de remover as placas amiloides e/ou NFT envolvidos no processo neurodegenerativo da DA, a prevenção dessa patologia mostra-se como uma estratégia fundamental (KUMAR & EKAVALI, 2015). Levando em conta que os compostos fenólicos presentes em algumas plantas podem influenciar positivamente a patologia DA e reduzir fatores de risco associados à doença devido a capacidade antioxidante que apresentam, o estudo do efeito neuroprotetor dessas moléculas é relevante (TAN et al., 2012).

O ácido tânico (AT) é um polifenol glicosídico hidrolisável de ácido gálico (SERRANO et al., 2009; BRAIDY et al., 2017) cujos efeitos neuroprotetores na DA foram demonstrados em alguns modelos *in vitro* e no modelo transgênico *in vivo* da doença (ONO et al., 2004; MORI et al., 2012; YAO et al., 2013), porém nenhum estudo avaliou a capacidade neuroprotetora do AT na DAE a qual representa a maioria dos casos (GIDYK et al., 2015). *In vivo*, o AT demonstrou inibição da atividade de β -secretase (enzima responsável pela produção A β), inibindo a formação de placas amiloides, evitando, portanto, a instalação de um processo neurodegenerativo, mantendo a memória integra dos animais tratados com o composto. Além disso, apresentou atividade anti-inflamatória o que é de grande valia no tratamento da doença visto que o processo inflamatório está envolvido na progressão da mesma (MORI et al., 2012). *In vitro*, o AT inibe tanto a agregação de A β , quanto de proteína Tau, inibindo a formação de placas amiloides e NFT, respectivamente, além de desestabilizar os agregados A β já formados tornando-o um composto promissor para o tratamento da DA (ONO et al., 2004; YAO et al., 2013).

2. Objetivos

Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo determinar *in vivo* a capacidade neuroprotetora do AT em modelo experimental de Demência Esporádica do Tipo Alzheimer (SDAT) induzido por STZ e investigar os mecanismos envolvidos nos efeitos apresentados pelo composto.

Objetivos específicos

- Verificar o efeito do pré-tratamento com AT sobre parâmetros comportamentais como locomoção e exploração (teste do campo aberto) e memória (testes de reconhecimento de objetos, labirinto em Y e esQUIVA inibitória) em ratos submetidos ao modelo de SDAT induzido por STZ.
- Avaliar o efeito do pré-tratamento com AT na atividade da enzima AChE em estruturas cerebrais de animais submetidos ao modelo animal de SDAT induzido por STZ.
- Verificar a atividade de ATPases e NKA total assim como das isoformas NKA $\alpha 1$ e NKA $\alpha 2,3$ em estruturas cerebrais de animais pré-tratados com AT submetidos ao modelo animal de SDAT induzido por STZ.
- Investigar o efeito do AT nos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo nas estruturas cerebrais de ratos no modelo animal de SDAT induzido por STZ.
- Avaliar o envolvimento do pré-tratamento com AT na via de sinalização PI3K-Akt em estruturas cerebrais no modelo animal de SDAT induzido por STZ.
- Avaliar o efeito do pré-tratamento com AT sobre a proteína SNAP-25 (um marcador de neurodegeneração) em cérebro de animais com SDAT induzida por STZ.

- Investigar o efeito do AT na neuroinflamação induzida por STZ no modelo animal de SDAT por meio da dosagem de citocinas em córtex cerebral.
- Avaliar a sobrevivência neuronal através de imunohistoquímica com anticorpo NeuN e da coloração com cresil violeta em cérebro de ratos pré-tratados com AT e submetidos ao modelo de SDAT induzido por STZ.

3. Revisão da Literatura

Doença de Alzheimer

A DA é uma doença neurodegenerativa com manifestações cognitivas e neuropsiquiátricas que resultam em um progressivo prejuízo das capacidades mentais e comportamentais do paciente levando a incapacitação. Atualmente é responsável por mais de 80 % dos casos de demência em pessoas idosas em todo o mundo. Cerca de 35 milhões de pessoas sofrem com a doença, e a expectativa, é que, até 2050, quando mais de 25 % da população será idosa, o número total de casos possa chegar a aproximadamente 100 milhões elevando em muito a demanda nos serviços de saúde (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2016; ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2017).

A DAF ou DA de início precoce, herdada geneticamente e responsável por menos de 10 % do total de casos na DA, está relacionada a alterações em diversos genes. Mutações nos genes APP (proteína precursora amiloide, uma proteína integral de membrana), PS1 e PS2 (presenilina 1 e 2 respectivamente, proteínas componentes do complexo γ -secretases) representam a forma autossômica dominante da doença responsável por menos de 1 % dos casos da DA e por 5-10 % dos casos da DAF sendo a mutação do gene PS1 a mais freqüente. O outro tipo da doença, a DAE ou DA de início tardio, que surge na idade avançada representa 90 % dos casos e é considerada multifatorial, contudo envolve também uma predisposição genética como, por exemplo, o gene ApoE4 (gene Apo E alelo ϵ 4) o qual está relacionado ao aumento do risco de desenvolvimento da DA, tanto na DAE quanto na DAF (CAUWENBERGHE; BROECKHOVEN; SLEEGERS, 2016).

Sabe-se que a APP é processada de forma proteolítica por α , β e γ secretases seguindo duas vias: a constitutiva (não amiloidogênica) ou a via amiloidogênica, levando à produção de diferentes peptídeos. Na via constitutiva, a proteólise de APP por α -secretases resultam em fragmentos não patogênicos. No entanto, na via amiloidogênica a proteólise de APP por β - e γ -secretases origina uma mistura de $A\beta$ com diferentes tamanhos, sendo os dois principais denominados de $A\beta_{1-40}$ (90%) e $A\beta_{1-42}$ (10%). Os fragmentos $A\beta_{1-42}$ são mais propensos à agregação e estão predominantemente presentes em

placas amiloides em cérebros de pacientes com DA (KUMAR & EKAVALI, 2015).

Inicialmente os peptídeos A β se agregam espontaneamente em oligômeros A β solúveis, e posteriormente aglomeram-se formando placas amiloides insolúveis, também chamadas de placas senis (Figura 1). Estudos recentes sugerem que o aparecimento dos oligômeros A β solúveis tenham um papel importante no início do prejuízo sináptico, enquanto que as placas amiloides aparentemente estariam relacionadas aos eventos tardios da doença (ANAND; GILL; MAHDI, 2014).

Os oligômeros A β produzidos por neurônios em associação com astrócitos próximos promovem hiperfosforilação da proteína tau (proteína associada a estabilização dos microtúbulos), a qual se agrega formando os chamados NFT, resultando em efeitos tóxicos nas mitocôndrias e nas células como um todo. O aparecimento das placas senis amiloides ativa a microglia, resultando em produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Estas citocinas estimulam neurônios a produzirem quantidades ainda maiores de oligômeros A β o que leva a uma degeneração neuronal e vascular ainda maior (Figura 1) (DAL PRÀ et al., 2015).

Durante o processo de perda neuronal na DA o sistema colinérgico é bastante afetado e os neurônios colinérgicos corticais sofrem uma redução significativa levando a um prejuízo das funções colinérgicas centrais (SCHIFILLITI et al., 2010). Sabe-se que o sistema colinérgico desempenha um papel central no funcionamento da memória e que a diminuição da sua função está associada a déficits cognitivos, perda de memória e desorientação como visto na DA (CHEN et al., 2013).

A atividade de ATPases, como por exemplo NKA, enzima envolvida no controle da neurotransmissão, também encontra-se comprometido na DA. Uma diminuição da atividade e expressão de ATPases afeta diretamente a sinalização de neurotransmissores prejudicando a aprendizagem e a memória (MOSELEY et al., 2003).

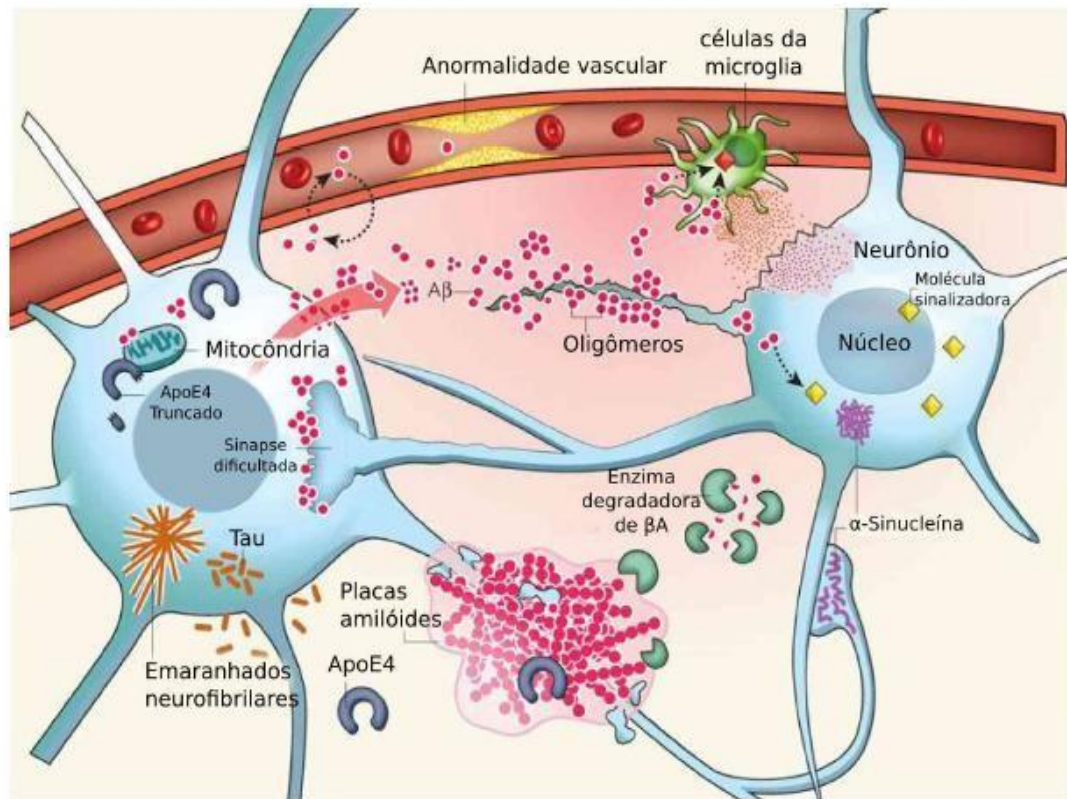


Figura 1- Mecanismos envolvidos na patogênese da DA. O acúmulo e a agregação de β -amiloide ($A\beta$) no cérebro pode ser resultado de um aumento na produção neuronal de $A\beta$, na diminuição da atividade de enzimas que degradam $A\beta$, ou alterações nos mecanismos de transporte de $A\beta$ através da barreira hematoencefálica. Oligômeros $A\beta$ prejudicam a função sináptica, enquanto que as placas amiloides alteram processos neuronais em geral. Oligômeros $A\beta$ interagem com receptores e com as membranas na superfície celular, alterando cascatas de transdução de sinal, modificando a atividade neuronal e desencadeando a liberação de mediadores neurotóxicos pela microglia (células imunes residentes). Anomalias vasculares prejudicam o aporte de nutrientes e a remoção de subprodutos metabólicos causando microinfartos e promovendo a ativação de astrócitos (não mostrados) e da microglia. A proteína transportadora de lipídeos ApoE4 aumenta a produção e prejudica a remoção de $A\beta$. No interior de neurônios, ApoE4 é clivada em fragmentos neurotóxicos que desestabilizam o citoesqueleto e, assim como os $A\beta$ intracelulares, prejudica a função mitocondrial. A proteína tau e a α -sinucleína podem também se aglomerar em oligômeros patogênicos e formar grandes agregados intraneuronais, danificando organelas vitais no interior da célula. (Adaptado de Mucke, 2009).

Sendo assim, as características histopatológicas presentes no parênquima cerebral de pacientes portadores da DA incluem depósitos fibrilares amiloidais associados a uma variedade de diferentes tipos de placas senis, acúmulo de filamentos anormais da proteína tau e consequente formação de NFTs, perda neuronal e sináptica, ativação da glia e inflamação,

observadas nas regiões cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas, incluindo o córtex cerebral e hipocampo (KUMAR & EKAVALI, 2015).

Estresse Oxidativo na Doença de Alzheimer

Sabe-se que o estresse oxidativo desempenha um importante papel no envelhecimento e na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas relacionadas à idade, como a DAE. Sendo assim, na busca de um melhor entendimento sobre os mecanismos envolvidos na DA, a relação do estresse oxidativo com a instalação e/ou a progressão da doença tem sido amplamente estudada (CHEN & ZHONG 2014; KAMAT et al., 2016; TÖNNIES & TRUSHINA, 2017; MEZZAROBBA et al., 2019; NAKABEPPU, 2019; PEÑA-BAUTISTA et al., 2019).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes associado a um prejuízo na função redox e a um dano macromolecular (SIES & ARTEEL, 2000; HALLIWELL, 2006, 2011; JONES, 2006). Está associado ao aumento da produção espécies reativas (ER), como radicais livres, espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), incluindo o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($OH^{\cdot}$), óxido nítrico (NO), peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) entre outros. Nas células, as ER são produzidas por diversas fontes incluindo o retículo endoplasmático, peroxissomos, oxidases como a NADPH oxidase, citocromo P450 e pelas mitocôndrias (HAUPTMANN et al., 1996; DI MEO et al., 2016). As células aeróbias, como parte de seu processo metabólico, durante a fosforilação oxidativa, geram H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ como subprodutos nos complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial, sendo esse processo o responsável pela geração do maior número de ER na célula (HALLIWELL, 2006; RAY et al., 2012; HOLMSTROM et al., 2014).

As ER geradas em baixas concentrações cumprem um importante papel fisiológico nos processos de sinalização intracelular (DROGE, 2002; PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007; VALKO et al., 2007; BARTOSZ, 2009; RAY et al., 2012) nos mecanismos de defesa orgânica contra processos infecciosos e no

desenvolvimento adequado da resposta inflamatória a um dano tecidual (HALLIWELL, 2006). Em condições normais, as defesas antioxidantes atuam como neutralizadoras mantendo os níveis fisiológicos adequados de ER. Entre as defesas antioxidantes podemos citar as enzimáticas como a SOD, GPX e a CAT e as defesas antioxidantes não enzimáticas, tanto endógenas, como glutathiona ou nutricionais como as vitaminas A, C e E, selênio, carotenoides e compostos fenólicos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; HOLMSTRÖM & FINKEL, 2014; RAJENDRAN et al., 2014; BETTIO et al., 2017).

O balanço adequado entre a produção de ER e as defesas antioxidantes é essencial para um funcionamento celular adequado. No entanto, uma exacerbada geração de ER com uma capacidade diminuída do organismo em neutralizá-las pode favorecer um estado pró-oxidante induzindo um grande número de alterações nos constituintes celulares, incluindo inativação de enzimas, danos às bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos e às proteínas, além de peroxidação dos lipídios de membrana (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; KRYSTON et al., 2011). Diversos fatores, incluindo a exposição à radiação, trauma, infecção, poluição, excesso de lipídios e açúcar, atividade física excessiva e até mesmo o envelhecimento podem favorecer a instalação deste estado pró-oxidante (HALLIWELL, 2006, 2011).

O sistema nervoso central é mais suscetível ao dano oxidativo devido ao grande consumo de oxigênio, abundância de ferro, quantidades reduzidas de antioxidantes, além de conter uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (BAIERLE et al., 2015). Sendo assim, o estresse oxidativo favorece a instalação e a progressão de processos neuropatológicos de uma série de doenças neurodegenerativas incluindo a DA (KUMAR et al., 2012; RYBKA et al., 2013; ZHANG & YAO, 2013; BAIERLE, et al., 2015; BONIFÁCIO et al., 2017).

De fato, diversos trabalhos têm demonstrado o envolvimento do estresse oxidativo na DA. Nessa patologia a atividade das enzimas antioxidantes está alterada contribuindo, assim, para um acúmulo de ER e, com isso, para a instalação do estresse oxidativo (KIM et al., 2006; UTTARA et al., 2009). Além disso, evidências mostram a existência de dano mitocondrial resultando em um aumento da produção de ER nos estágios iniciais da DA, antes mesmo do aparecimento da patologia β -amiloide e dos sintomas clínicos (UTTARA et al.,

2009). Corroborando com esses dados, marcadores do estresse oxidativo incluindo altos níveis de proteínas oxidadas, produtos glicosilados, extensiva peroxidação lipídica, formação de alcoóis, aldeídos, carbonilas livres, cetonas e modificações oxidativas no RNA e no DNA nuclear e mitocondrial foram encontrados em tecido cerebral e sistemas periféricos de pessoas portadoras de ApoE4 em estágio pré clínico ou inicial da DA (SCHIPPLING et al., 2000; RAMASSAMY et al., 2001; PICKLO et al., 2002; SULTANA et al., 2011).

Além da produção de ER, a homeostase anormal de metais bioativos como ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), magnésio (Mg), manganês (Mn), e alumínio (Al) podem estar envolvidos na produção de radicais livres e no estresse oxidativo influenciando a agregação de A β e tau (LIU et al., 2006; GREENOUGH; CAMAKARIS; BUSH, 2013; WANG & WANG, 2016). Um aumento nos níveis de Fe, Cu e Zn foi detectado próximo as placas amiloides em cérebro de pacientes com a DA e em modelos transgênicos animais (LOVELL et al., 1998; LEE et al., 2002; MILLER et al., 2006; STOLTENBERG et al., 2007). Os metais atuam tanto afetando o processamento da APP, quanto se ligando diretamente a A β promovendo a agregação (TOUGU et al., 2008; MANTYH et al., 1993). Além disso, podem promover a fosforilação de tau e a formação de NFT (SAYRE et al., 2000; BOOM et al., 2009). Os metais ainda catalisam reações onde o produto gerado é uma ER como no caso da reação de Fenton, onde O $_2^{\cdot-}$ e H $_2$ O $_2$ são convertidos em OH $\cdot$, uma espécie mais reativa que as anteriores. Uma ligação direta de alguns metais a A β contribuem para o aumento do estresse oxidativo e a produção extramitocondrial de ER. O acúmulo desses metais é em primeiro lugar originado pelo prejuízo da homeostase neuronal afetada pela idade e exacerbado pela patologia amiloide e tau no caso da DA (BOOM et al., 2004; BARNHAM & BUSH, 2014).

Outra fonte da produção de ER mediada diretamente por A β envolve a ativação da microglia no cérebro durante a resposta inflamatória ao depósito de placas amiloides extracelulares (NAKAJIMA & KOHSAKA, 2001). Além disso, os níveis elevados de A β podem acelerar a produção de ER por se ligarem diretamente a membrana mitocondrial, alterando o funcionamento e a dinâmica mitocondrial, levando a prejuízos no metabolismo energético e a perda de função sináptica (MANCZAK et al., 2006; GIBSON & KARUPPAGOUNDER, 2008). O estresse oxidativo associado à membrana, induzido por peptídeo A β

perturba o metabolismo de colesterol que por sua vez desencadeia uma cascata neurodegenerativa levando a um acúmulo adicional de A β , hiperfosforilação de tau e sintomas clínicos da doença (MATTSON; CUTLER; JO, 2005; HAUGHEY et al., 2010). Sendo assim, os dados atuais sugerem que alterações no funcionamento mitocondrial, aumento do estresse oxidativo, deficiente defesa antioxidante, produção de A β e fosforilação de tau podem representar um ciclo vicioso que com o tempo exacerba o processo patológico eventualmente levando a morte neuronal (TRUSHINA & MCMURRAY, 2007) (Figura 2).

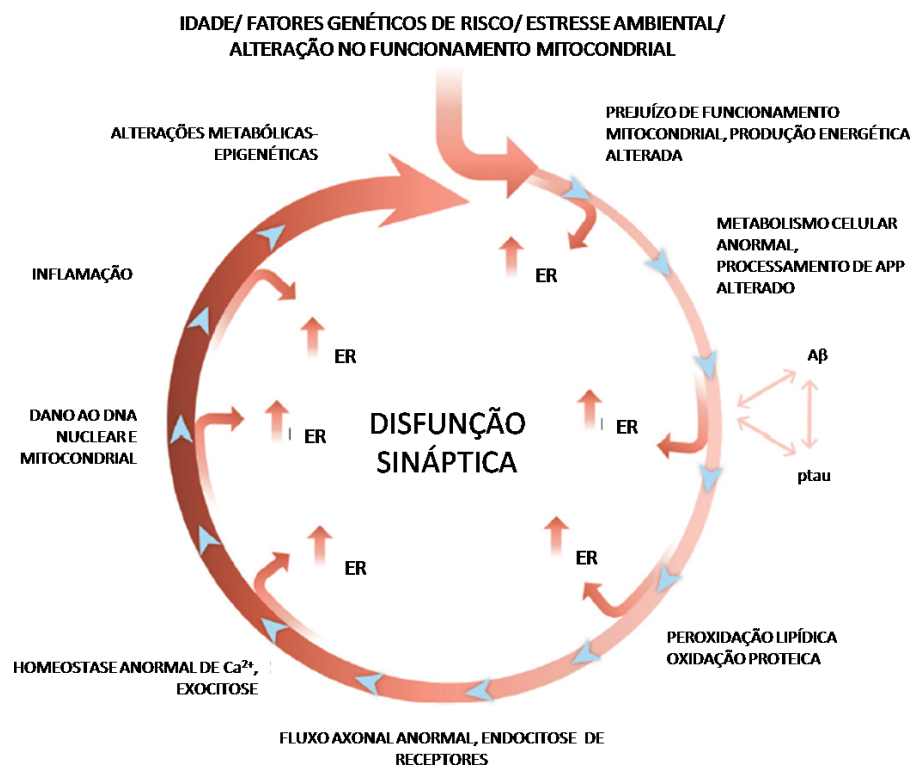


Figura 2- Fatores de risco genéticos e ambientais contribuem para o desenvolvimento da Doença de Alzheimer Esporádica (DAE). Com a idade o aumento de alterações nas funções mitocondriais e aumento na produção de espécies reativas (ER) podem iniciar um ciclo vicioso, onde múltiplos mecanismos e sistemas afetados pelas ER exacerbam a produção de mais ER, acelerando o dano celular e levando a disfunção sináptica. (Adaptado de TÖNNIES & TRUSHINA, 2017).

Levando em conta que no cérebro a energia livre necessária para direcionar a maioria das reações celulares é produzida primeiramente na mitocôndria pela oxidação da glicose em condições aeróbias, um prejuízo no metabolismo desse combustível pode ser um fator indicativo da presença de estresse oxidativo (VALLA et al., 2010; REDDY et al., 2012; TRUSHINA et al., 2012; 2013). Sendo assim o envolvimento do estresse oxidativo com a fisiopatologia da DA pode estar relacionado à resistência à insulina (RI) promovida pelas ER. Já está bem documentado que o dano oxidativo pode levar a um quadro de RI e evidências demonstram que essa resistência está potencialmente ligada ao aumento do risco de desenvolvimento tanto da DA, quanto outros distúrbios neuropsiquiátricos e neurodegenerativos, pois pode levar a alterações na via de sinalização PI3K-Akt envolvida diretamente nos processos de sobrevivência celular (GANCHEVA et al., 2017; JHA et al., 2017).

Alterações na via de sinalização PI3K-Akt na Doença de Alzheimer

Diversas hipóteses tentam explicar a patogênese da DA. Segundo a hipótese da glicodeprivação cerebral, o hipometabolismo da glicose associado à disfunção mitocondrial, em regiões cerebrais propensas a DA, como o córtex e o hipocampo, é uma alteração metabólica presente antes mesmo do aparecimento de oligômeros β -amiloides e hiperfosforilação de proteína tau (DU et al., 2010; REDDY, 2011; SULTANA et al., 2011; TRUSHINA et al., 2012; SCHMITT et al., 2012; CALDWELL; YAO; BRINTON; 2015; GRIEB et al., 2016). De fato, a análise de cérebro de indivíduos portadores dos genes envolvidos com o surgimento da DAF mostraram uma deficiente captação de glicose cerebral independente da atrofia cerebral. Essa alteração é detectada três décadas antes do início esperado de sintomas clínicos da doença (MOSCONI et al., 2008), mostrando que a diminuição da capacidade dos tecidos cerebrais para metabolizar a glicose é um sinal muito precoce na DA. Além disso, esse metabolismo também está reduzido em indivíduos de diversos grupos de risco para a DA, incluindo pacientes com comprometimento cognitivo leve, estágio prodrômico da DA e portadores do gene ApoE4

(REIMAN et al., 2004; MOSCONI; PUPI; DE LEON, 2008; JAGUST & LANDAU; 2012). Em analogia ao diabetes tipo 2, onde há uma capacidade diminuída de tecidos periféricos para metabolizar a glicose, o termo diabetes tipo 3 foi proposto para DA baseado no hipometabolismo de glicose cerebral observado nessa patologia (GRIEB et al., 2016).

Neste contexto, vários trabalhos mostram que uma inadequada regulação da via de sinalização PI3K-Akt, devido à dessensibilização, ou seja, a remoção de respostas normais à insulina e IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1) (seus principais ativadores), no cérebro, é uma característica inicial da DA (BRUNET et al., 2001, LIU et al., 2011). O controle adequado da via de sinalização PI3K/Akt integra fisiologicamente respostas fundamentais para o envelhecimento e longevidade saudáveis, sendo, portanto essencial para evitar o aparecimento de doenças do envelhecimento como a DA (O' NEILL, 2013).

Em resposta à insulina e IGF-1, seus respectivos receptores, IGF-1R e IR, receptores tirosina cinase, desencadeiam sua autofosforilação levando à ativação do substrato receptor de insulina (IRS) por fosforilação da tirosina, ativando, assim, PI3K. PI3K fosforila o lipídio de membrana PtdIns(4,5)P₂ para gerar PtdIns(3,4,5)P₃. O aumento nos níveis de PtdIns(3,4,5)P₃ recruta Akt para a membrana com ativação via fosforilação em Thr-308 induzida por PDK-1 (proteína cinase-1 dependente de fosfatidilinositol) e em Ser-473 induzida primariamente por mTORC2 (alvo da rapamicina-2 em mamífero) mas também por DNA-PK (proteína cinase dependente de DNA) (FRANKE, 2008; HERS; VINCENT;TAVARE, 2011) (Figura 3).

As ações da Akt são complexas, mas predominantemente atua em sistemas anabólicos, de síntese e de crescimento em três alvos principais: mTORC1 (alvo da rapamicina-1 em mamífero), GSK3β (glicogênio sintase cinase 3β) e FOXO (fator de transcrição FOXO) modulando plasticidade sináptica, polaridade neuronal, neurotransmissão, proteostase, controle metabólico e respostas ao estresse, incluindo reparo ao DNA (O' NEILL, 2013) (Figura 3).

Akt ativa mTORC1 aumentando a síntese e translação proteica e inibe a macroautofagia e mTORC2 responsável pela regulação do citoesqueleto (GARELICK & KENNEDY, 2011). GSK3β e FOXO são inativadas por Akt,

GSK3 β induz a síntese de glicogênio e aumento da síntese lipídica, enquanto FOXO atua na transcrição de genes de resposta ao estresse e sistemas de reparo em situações onde os sistemas celulares são privados de nutrientes (KLOET & BURGERING, 2011) (Figura 3).

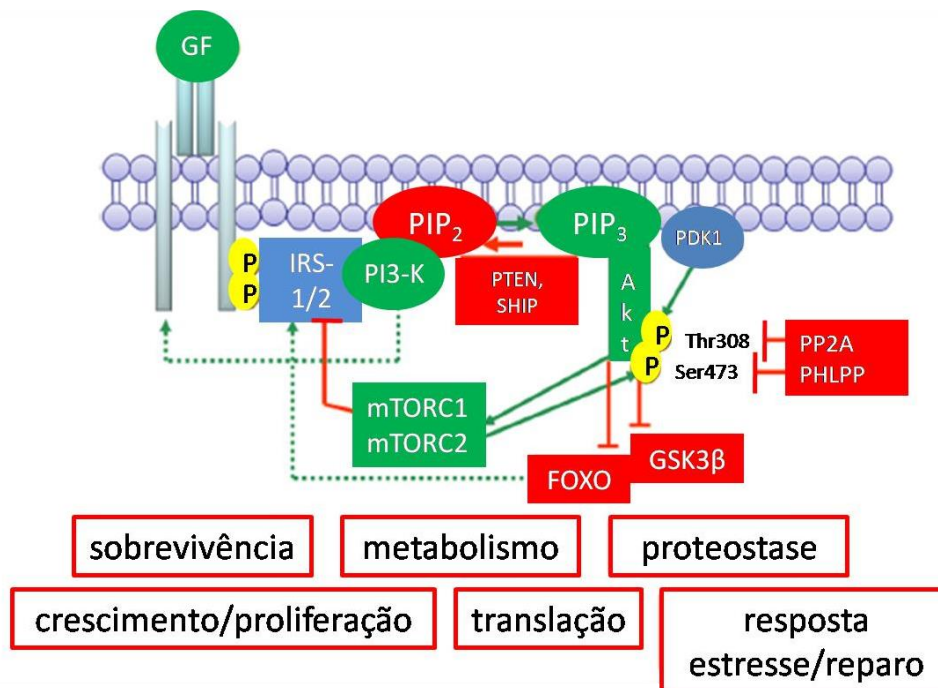


Figura 3- Mecanismos de ativação/desativação que modula a via de sinalização PI3K/Akt. Os mecanismos de ativação e desativação estão indicados em verde e vermelho respectivamente. Primeiramente, insulina, IGF-1 e outros fatores de crescimento ativam seu receptor tirosina cinase desencadeando sua autofosforilação que ativa proteínas IRS por fosforilação da tirosina ativando PI3K. PI3K fosforila PtdIns(4,5)P₂ para gerar PtdIns(3,4,5)P₃ recrutando Akt para a membrana induzindo mudanças conformacionais na Akt permitindo a associação a PDK1 para fosforilar Akt na Thr-308 levando a ativação de Akt, seguida da fosforilação em Ser-473 induzida por mTORC2 para ativação completa de Akt. Akt uma vez totalmente ativada fosforila uma ampla gama de substratos para regular funções celulares, incluindo mTOR (ativada); GSK3 β (inativada) e FOXO (inativada). O principal mecanismo de inibição de PI3K-Akt inclui PTEN que desfosforila PtdIns(3,4,5)P₃, PP2A e PHLPPs que desfosforilam Akt e um mecanismo de *feedback* negativo via mTOR inativando IRS-1 (Adaptada de O'NEILL, 2013).

Os principais inativadores da via PI3-K/Akt incluem PTEN (fosfatase homóloga à tensina deletada no cromossomo 10) que desfosforila PtdIns(3,4,5)P₃, PP2A (proteína fosfatase 2A) e PHLPPs (proteínas fosfatases com domínio rico em leucina) que desfosforilam Akt e um *feedback* negativo através da fosforilação de serina e consequente inativação de IRS-1 mediado por m-TOR (HERS; VINCENT, TAVARE, 2011) (Figura 3).

Levando em conta que a via de sinalização PI3K/Akt desempenha um papel central na sobrevivência neuronal o desenvolvimento de uma resistência a insulina no cérebro e conseqüente redução na atividade de sinalização dessa via com conseqüente superativação de GSK3 β e diminuição nos níveis de transportadores de glicose são mecanismos chave para o desenvolvimento da DA, levando a degeneração neurofibrilar (DENG et al., 2009; GRIEB, 2016).

Neuroinflamação e a Doença de Alzheimer

Pesquisas envolvendo modelos animais e estudos em pacientes indicam uma conexão entre doenças neurodegenerativas e neuroinflamação (AMOR et al., 2010). Modificações do estado fisiológico do cérebro durante o envelhecimento resultam em um aumento da resposta inflamatória, incluindo aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, predispondo, desse modo, indivíduos a várias condições associadas ao envelhecimento, incluindo a DA (FINCH & MORGAN, 2007). Alguns estudos têm indicado que o dano neuronal progressivo associado à DA pode ser conseqüência de reações inflamatórias locais no sistema nervoso central (AKIYAMA et al., 2000a; TUPPO & ARIAS, 2005; WYSS-CORAY, 2006).

Componentes inflamatórios associados à neuroinflamação na DA incluem células gliais, como microglia e astrócitos, o sistema complemento, e citocinas e quimiocinas. Os mediadores inflamatórios da classe das citocinas são secretados pela microglia e astrócitos que rodeiam as placas neuríticas de A β . Os mediadores inflamatórios liberados nesse processo estimulam neurônios a produzirem quantidades ainda maiores de oligômeros A β o que leva a uma degeneração neuronal e vascular ainda maior (DAL PRÀ et al., 2014). Neste sentido, tem sido proposto que uma fagocitose ineficiente da A β por parte da microglia, e a conseqüente hiperativação celular (astrócitos e microglia reativos) e liberação de mediadores inflamatórios e fatores neurotóxicos, contribuiria de maneira decisiva no processo neurodegenerativo verificado na DA (AKIYAMA et al., 2000b).

Existem evidências de que as três principais citocinas pró-inflamatórias -

IL-1 β , IL-6 e TNF- α - podem levar a morte neuronal e disfunção cerebral. Entre elas, TNF- α e IL-6 podem contribuir significativamente potencializando o processo neuroinflamatório observado na DA (ROSENBERG, 2005). Dessa forma, a relação destas duas citocinas com a DA, tem sido frequentemente investigada e recebido grande atenção da pesquisa clínica (AKIYAMA et al., 2000b; BROSSERON et al., 2014).

TNF- α é uma das principais citocinas pró-inflamatórias que desempenha um papel central no início e na regulação do cascata de citocinas durante uma resposta inflamatória (KIM; LEE; KIM, 2017). Sua produção é realizada principalmente por células do sistema imunológico, incluindo macrófagos, monócitos e linfócitos, em resposta a agentes patogênicos ou durante condições de estresse no organismo. Em relação ao sistema nervoso central, a micróglia e astrócitos são considerados os produtores primários de TNF- α . Através da associação com um de seus receptores celulares, denominados receptor do TNF tipo 1 (TNFR1 ou p55) e receptor do TNF tipo 2 (TNFR2 ou p75), o TNF- α ativa diferentes cascatas intracelulares que regulam diversas funções celulares, incluindo respostas inflamatórias, diferenciação e apoptose (PALLADINO et al., 2003). Ao nível celular, a principal função atribuída ao TNF- α é sinalizar para a ativação da transcrição de outras proteínas envolvidas na resposta inflamatória, incluindo a IL-1, IL-6 e IL-8, as quimiocinas e as moléculas de adesão (KIM; LEE; KIM, 2017). Além disso, o TNF- α é um fator fundamental na regulação do balanço entre a ativação de vias de sinalização pró- e anti-apoptóticas no controle da proliferação celular e na resposta inflamatória (BAUD & KARIN, 2001).

IL-6 é uma citocina cuja expressão é induzida por TNF- α . É multifuncional, desempenhando um papel importante na defesa do hospedeiro, regulando a resposta inflamatória e induzindo uma resposta de fase aguda durante o início do curso de uma infecção (HAMMACHER et al., 1994; RAIVICH et al., 1999).

Tem sido demonstrado um aumento nos níveis de diversos mediadores pró-inflamatórios no cérebro de pacientes com a DA (MOORE & O'BANION, 2002; GALIMBERTI et al., 2003). Evidências indicam um aumento na expressão do TNFR1 no cérebro, bem como nos níveis de TNF- α no cérebro e plasma dos pacientes (FILLIT et al., 1991; TARKOWSKI, 2002; LI et al., 2004).

Vários estudos já relataram aumento dos níveis séricos e plasmáticos de IL-6 em pacientes com DA em comparação com pacientes controles. Sendo assim níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , têm sido considerados biomarcadores para DA (DINARELLO, 2007, WANG et al., 2015, ALAM et al., 2016).

Modelo de Demência Esporádica do Tipo Alzheimer induzido por estreptozotocina

Embora muitos mecanismos envolvidos na DA já estejam bem elucidados algumas lacunas ainda permanecem, o que impossibilita o desenvolvimento de terapias eficazes contra a doença. Centenas de drogas candidatas a novas terapias para a DA, já foram testadas, e, infelizmente, nenhuma foi traduzida em uma terapia bem-sucedida em humanos (FARLOW ; MILLER; PEJOVIC, 2008; KURZ & PERNECZKY, 2011). Vários fatores foram propostos como possíveis causas fundamentais desta falha, mas de fato, entender e reproduzir exatamente os mecanismos fisiopatológicos envolvidos pode ser a questão fundamental na busca por terapias (KUMAR & DOGRA, 2008).

Neste sentido, para o estudo de possíveis alvos terapêuticos e para a triagem de potenciais compostos que possam vir a ser usados no tratamento da DA foram desenvolvidos diversos modelos animais. Estes modelos promovem acesso *in vivo* da patologia da doença possibilitando o estudo das interações entre células e sistemas, bem como a avaliação de alterações cognitivas em testes de memória e aprendizagem (PUZZO et al., 2014). O modelo de SDAT que emprega a administração icv de STZ, uma toxina diabetogênica, promove a deficiência de glicose e energia cerebral levando a déficits progressivos na aprendizagem e memória (LANNERT & HOYER, 1998; SALKOVIC-PETRISIC; OSMARNOVIC-BARILAR; KNEZOVIC, 2014).

A STZ leva a mudança na sinalização e nos receptores de insulina no cérebro e reduz enzimas chaves da via glicolítica no córtex cerebral e hipocampo cerebral, o que leva ao declínio dos níveis de compostos ricos em energia como o ATP (LANNERT & HOYER, 1998). Também produz dano

neuronal por causar estresse oxidativo através da produção de ERN, aumento dos níveis de malondialdeídos, hiperfosforilação da proteína tau, acúmulo de A β no cérebro e prejuízos na transmissão colinérgica culminando para uma atrofia cerebral (GRIEB et al., 2016). Sendo assim o modelo SDAT induzido por STZ mimetiza amplamente as características da doença o que é de grande valia na pesquisa científica (GRIEB et al., 2016).

Ácido Tânico

Tendo em vista que os tratamentos utilizados atualmente para a DA tem como alvo somente os sintomas da doença e não a causa (e mesmo assim um grande número de pacientes não responde satisfatoriamente a terapia disponível) e que nenhuma terapia é capaz de destruir os agregados amiloides e reverter o processo neurodegenerativo uma vez instalado a prevenção dessa patologia mostra-se como uma estratégia bastante interessante (KUMAR & EKAVALI, 2015). Na busca por estratégias farmacológicas preventivas deve-se levar em conta a variedade de compostos bioativos naturalmente encontrados na natureza e que compõe a dieta, os nutracêuticos. A literatura sugere que o teor elevado de polifenóis presente em algumas plantas possa influenciar positivamente a patologia da DA reduzindo fatores de risco associados à doença, e tal propriedade é atribuída ao elevado potencial antioxidante desses compostos (TAN et al., 2012).

O AT é um polímero polifenol glicosídico hidrolisável de ácido gálico, e categorizado de acordo com sua estrutura como um flavonoide (Figura 4). É naturalmente encontrado em várias plantas herbáceas e lenhosas, incluindo leguminosas, sorgo, feijão, bananas, caquis, framboesas, vinhos e uma ampla seleção de chás (SERRANO et al., 2009). Clinicamente, apresenta ação antioxidante neutralizando espécies reativas, propriedades anti-inflamatórias, anti-virais/bacterianas, anti-cancerígenas e neuroprotetoras (BRAIDY et al., 2017).

Os efeitos neuroprotetores do AT na DA foram demonstrados em alguns modelos *in vitro* e *in vivo* (ONO et al., 2004; YAO et al., 2013; MORI e colaboradores, 2012) mas nenhum estudo avaliou a capacidade neuroprotetora

do AT na DAE que representa a maioria dos casos da doença (GIDYK et al., 2015). *In vivo* Mori et al., 2012 demonstraram que o AT previne o prejuízo cognitivo em um modelo animal transgênico de demência do tipo Alzheimer (PSAPP). Esse efeito foi associado à inibição da atividade de β -secretase (reduzindo a produção de $A\beta$) e atividade neuroinflamatória do composto, prevenindo assim a progressão da patologia amiloide cerebral. Mori e colaboradores, 2012 ainda demonstraram que o AT é capaz de reduzir significativamente a produção de $A\beta$ e reduzir a proteólise amiloidogênica de APP *in vitro* em células humanas mutantes que superexpressam APP. Além disso, *in vitro*, o AT também demonstrou capacidade de inibir a agregação de proteína tau (YAO et al., 2013) e $A\beta$, desestabilizando os agregados $A\beta$ pré-formados (ONO et al., 2004).

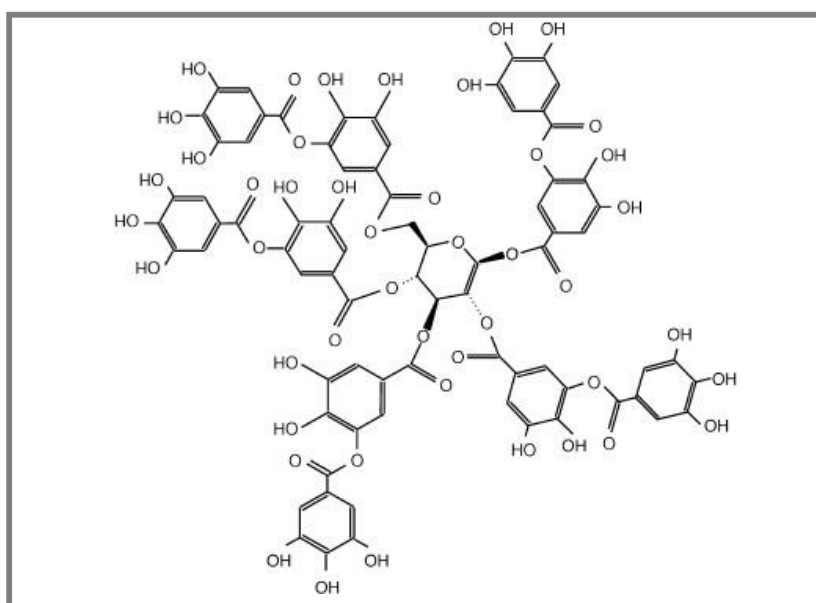


Figura 4 - Estrutura química do Ácido Tânico

Considerando que a etiologia da DA permanece sem ser totalmente elucidada, as estratégias que visam caminhos comuns, particularmente usando abordagens de estilo de vida, como exercícios e nutrição sugerem uma importante abordagem sinérgica para a prevenção de doenças relacionadas à idade como a DAE. Nesse sentido a suplementação de AT na dieta pode se apresentar como uma promissora ferramenta preventiva nessa patologia ainda sem tratamento eficaz, tornando relevante o estudo da sua ação neuroprotetora

frente às alterações bioquímicas e comportamentais dessa doença em um modelo SDAT induzido por STZ.

4. Artigo

Artigo aceito para publicação no
periódico internacional *Archives of
Physiology and Biochemistry*
doi: 10.1080/13813455.2019.1673430

Effects of tannic acid in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease: insights into memory, redox status, Na⁺,K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activity

Mariana F. B. Gerzson^a; Simone M. Pacheco^b; Mayara S. P. Soares^b; Natália P. Bona^a; Pathise S. Oliveira^a; Juliana H. Azambuja^b; Pauline da Costa^c; Jessié M. Gutierrez^c; Fabiano B. Carvalho^c; Vera M. Morsch^c; Roselia M. Spanevello^{b*}; Francieli M. Stefanello^{a*}

^aLaboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brazil.

^bLaboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brazil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

***Address reprint requests to:** Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, CEP 96160-000, Capão do Leão, RS, Brazil. Phone: +55 53 32757355

Email addresses:

Francieli Moro Stefanello; fmstefanello@gmail.com

Roselia Maria Spanevello; rspanevello@gmail.com

Abstract

The aim of this study was to investigate the ability of tannic acid (TA) in preventing memory deficits and neurochemical alterations observed in a model for Sporadic Dementia of Alzheimer's Type. Rats were treated with TA (30 mg/kg) daily for 21 days, and subsequently received intracerebroventricular injection of streptozotocin (STZ). We observed that STZ induced learning and memory impairments; however, treatment with TA was able to prevent these effects. In cerebral cortex and hippocampus, STZ induced an increase in acetylcholinesterase activity, reduced Na^+, K^+ -ATPase activity and induced oxidative stress increasing thiobarbituric acid-reactive substances, nitrites and reactive oxygen species levels and reducing the activity of antioxidant enzymes. Treatment with TA was able to prevent the major of these neurochemical alterations. In conclusion, TA prevented memory deficits, alterations in brain enzyme activities, and oxidative damage induced by STZ. Thus, TA can be an interesting strategy in the prevention of Sporadic Alzheimer's Disease.

Keywords: Natural product; Antioxidant; Dementia; Acetylcholinesterase; ATPases

1. Introduction

Alzheimer Disease (AD) is an incapacitating neurodegenerative disease leading to the progressive cognitive decline affecting approximately 44 million people worldwide being the sporadic type the most common, accounts for 85% of cases [1]. Decreasing brain glucose consumption is an early sign of Sporadic Alzheimer's Disease (SAD); so the reduced ability of brain tissues to metabolize glucose is central to when neurodegeneration is initiated, and the development of amyloid deposits and neurofibrillary tangles made of hyperphosphorylated tau proteins follow [2]. Consequently, diabetes has been recognized as a contributor to the risk for developing dementia, confirming the relationship between insulin resistance in the brain and SAD; some studies even mention the occurrence of SAD-like type 3 diabetes [2]. SAD and type 2 Diabetes are multifactorial in their etiology and strategies using lifestyle approaches, such as nutrition which could enhance glucose control, lower insulin resistance and reduce inflammation, are interesting to prevent these diseases [3].

Naturally occurring dietary compounds with high polyphenol content, like tannic acid (TA), may reduce the risk factors associated with AD owing to their powerful antioxidant properties [4]. It is a plant-derived hydrolysable tannin polyphenol, a gallic acid polymer glucoside naturally found in several herbaceous and woody plants, wines, and a broad selection of teas [5]. TA has been shown antioxidant, anti-inflammatory, anti-viral/bacterial, anti-carcinogenic, and neuroprotective properties [6]. The effects of TA against AD have been demonstrated in some *in vitro*, as well as *in vivo* transgenic models of AD [7,8,9]. However, there has been no study evaluating the protective capacity of TA against SAD [1]; hence, TA supplementation represents an interesting preventive strategy for AD.

In the present study, we investigated the ability of TA in preventing memory deficits using an intracerebroventricular (*icv*) administration of streptozotocin (STZ) in a rat model for Sporadic Dementia of Alzheimer's Type (SDAT). This model mimics many pathological processes of SAD, such as impaired brain glucose and energy metabolism, which leads to progressive deficits in learning and memory [10]. We examined the effects of STZ and TA on locomotor ability and the capacity for learning and memory. To understand the biochemical mechanisms involved in the effects elicited by STZ and TA, we

also evaluated the activities of acetylcholinesterase (AChE) and Na^+, K^+ -ATPase (NKA); furthermore, we also looked at oxidative stress markers known to be altered in SAD.

2. Materials and methods

Animals

Male Wistar rats (60-day-old) were kept under a constant temperature, humidity and illuminated, with food and water *ad libitum*. All procedures were carried out according to the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals. This work was approved by the Ethical Committee of Animal Experimentation of the institution (CEEAA 4611-2015).

Experimental design

Animals were divided into four groups: control (CTRL), tannic acid (TA), streptozotocin (STZ), and tannic acid plus streptozotocin (TA+STZ). Rats of TA and TA+STZ groups were treated by gavage with TA (30 mg/kg, b.w.) [8] per 21 days and the others groups received vehicle (water). At the 22th day animals were submitted to surgery in stereotaxic apparatus [11]. The STZ and TA+STZ groups received bilateral *icv* injection of 5 μL /site of STZ (3 mg/kg, b.w.) [12] and others received vehicle (citrate buffer) (Figure 1). After recovery, behavioral tests were evaluated and treatment was reestablished. Next, the animals were euthanized by decapitation and the cerebral cortex and hippocampus were separated and stored at -80°C until utilization to biochemical analysis. Cerebral cortex and hippocampus were used because of their involvement in behavioral and cognitive function. These structures were homogenized in appropriated buffer solution on ice and the supernatant was used in the assays.

Behavioral procedures

Open-field test

The open-field test was carried out to identify locomotor ability. The apparatus consisted of a box with the floor of the arena divided into 16 equal squares. The number of segments crossed with the four paws in 5 min was record [13].

Object recognition task

This test was used for the assessment of learning and recent memory in rats [14]. In the training phase two identical objects were placed in the arena; 3 h after rats were allowed to explore one familiar (A) and one novel (B) object in the test session. Exploration was defined as the time spent sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws during 5 min. The objects presented similar textures, colors and sizes, but distinctive shapes. An exploratory preference (%) was expressed by the ratio $(T1 \times 100) / T2$, $T1$ = time spent in exploring the novel object (B); $T2$ = time total spent in exploring the two objects (A+B).

Y-maze test

Rats performed a Y-maze memory task to measure learning and spatial recognition memory [15]. During training rats were allowed to explore only two arms for 5 min. Two hours later, for the test, rat was placed back in the maze, with free access to all three arms for 5 min. An exploratory preference (%) was expressed by the ratio $(T1 \times 100) / T2$, $T1$ = time spent in exploring the novel arm; $T2$ = time total, 5 min.

Biochemical assays

AChE activity determination

Assessment of AChE activity was carried out using 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) as previously described [16].

Determination of ATPase activity

To determine NKA activity the amount of inorganic phosphate (P_i) released was quantified [17]. Different concentrations of ouabain were used to evaluate the activity of isoforms of NKA [18].

Oxidative Stress Parameters

To determine thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) content tissue supernatant was mixed with trichloroacetic acid and thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 60 min [19].

Total thiol content was evaluated by the reduction of DTNB by thiols, which in turn, becomes oxidized (disulfide) generating derivative TNB is measured spectrophotometrically [20].

Nitrite concentrations were measured using Griess reagent [21].

The oxidation of dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) was examined for the detection of intracellular ROS [22].

The reaction to measure catalase (CAT) activity is based in the decomposition of H_2O_2 [23]. The inhibition of superoxide, dependent adrenaline auto-oxidation, was measured to determine superoxide dismutase (SOD) activity [24]. Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured using commercially diagnostic kits (RANDOX-Brazil).

Protein determination

Protein was determined and compared with bovine serum albumin [25].

Serum glucose determination

Measurements of serum glucose levels were determined using commercially diagnostic kits (Labtest, MG, Brazil).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by two-way ANOVA and *post-hoc* comparison was used when appropriate (Bonferroni test). The main effects were presented only when interactions were not significant. A value of $p < 0.05$ was considered significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7.0 software. All experimental results are given as the mean (s) $\pm$ SEM.

3. Results

TA prevents behavioral changes induced by STZ

The training session of the object recognition test did not show an interaction between the test groups suggesting no significant differences (data not shown). In the test phase (Fig. 2A) STZ treatment decreased the total time spent in exploration of a new object vs. control group and treatment with TA

was able to prevent this effect maintaining memory integrity [$F_{(1,48)} = 12.65$; $p < 0.001$].

Fig. 2B shows that the treatment with TA was able to prevent spatial memory impairment induced by STZ in the test phase in the Y-maze test [$F_{(1, 26)} = 5.86$; $p < 0.05$]. The animals of STZ group spent less time (s) in the novel arm than the control animals and treatment with TA prevented this effect. No significant difference was observed between the groups during training (data not shown).

In the open field test, neither TA nor STZ altered the number of crossings (Fig. 2C) compared to the control animals [$F_{(1,50)} = 0.12$; $p > 0.05$], suggesting that TA and STZ did not cause any motor change.

TA restores AChE and ATPase activities in an *icv*-STZ model

TA treatment prevents the increase in AChE activity in the cerebral cortex [$F_{(1, 23)} = 8.82$; $p < 0.01$] and in the hippocampus [$F_{(1, 18)} = 6.88$; $p < 0.05$] induced by *icv*-STZ (Fig. 3A and B respectively). TA also prevents the decrease in total ATPase activity in the cerebral cortex [$F_{(1, 15)} = 4.909$; $p < 0.05$] and in the hippocampus [$F_{(1, 15)} = 6.05$; $p < 0.05$] induced by *icv*-STZ (Fig. 4A and 5A respectively).

Fig. 4B and 5B revealing significant differences between the tests groups vs. control groups in the total NKA activity in the cerebral cortex [$F_{(1, 16)} = 12.57$; $p < 0.01$] and hippocampus [$F_{(1, 16)} = 7.67$; $p < 0.05$] of rats suggesting that TA treatment prevents the decrease in total NKA activity induced by *icv*-STZ in these structures.

TA significantly prevents the decreased NKA α 2,3 activity induced by *icv*-STZ in this cerebral cortex [$F_{(1, 16)} = 13.13$; $p < 0.01$] but no significant differences in NKA α 2,3 activity were observed in the cerebral hippocampus (Fig. 4C and 5C respectively).

Additionally, a significant interaction between the experimental groups in NKA α 1 activity in the cerebral cortex [$F_{(1, 19)} = 10.82$; $p < 0.01$] and in the hippocampus [$F_{(1, 19)} = 10.30$; $p < 0.01$] was observed suggesting that TA treatment prevents the decreased activity of the enzyme induced by *icv*-STZ (Fig. 4D and 5D).

Effect of TA and STZ treatment on brain oxidative stress

markers

Statistical analysis showed a significant enhancement in TBARS in STZ vs. control group; however, TA prevented this increase in the cortex [$F_{(1, 15)} = 10.93$; $p < 0.01$] and hippocampus [$F_{(1, 15)} = 9.40$; $p < 0.01$] (Table 1). As regards nitrite and ROS levels, ANOVA did not show an interaction in these parameters of the cerebral cortex, but showed a significant main effect of STZ [Nitrite: $F_{(1, 23)} = 13.09$; $p < 0.01$, ROS: $F_{(1, 12)} = 16.29$; $p < 0.01$]. In the hippocampus, statistical analysis showed an interaction on the nitrite [$F_{(1, 23)} = 6.09$; $p < 0.05$] and ROS [$F_{(1, 13)} = 19.31$; $p < 0.05$] levels, suggesting that TA treatment prevents nitrite and ROS production in this structure induced by *icv*-STZ (Table 1). Total thiol content in the cerebral cortex [$F_{(1, 18)} = 0.81$; $p > 0.05$] and hippocampus [$F_{(1, 17)} = 2.14$; $p > 0.05$] was not altered by TA and STZ (Table 1).

Table 2 shows the effects of TA and STZ on the activity of antioxidant enzymes. The rats administered with STZ exhibited a significantly decreased SOD activity; however, treatment with TA prevented this alteration [$F_{(1, 19)} = 12.22$; $p < 0.01$]. In the hippocampus, statistical analysis did not show a significant interaction [$F_{(1, 19)} = 3.68$; $p > 0.05$] between the experimental groups for SOD activity. An interaction [$F_{(1, 17)} = 5.39$; $p < 0.05$] in CAT activity in the cerebral cortex suggesting that TA prevents the reduction of this enzyme induced by *icv*-STZ. However, TA or STZ did not affect CAT activity in the hippocampus [$F_{(1, 17)} = 0.49$; $p > 0.05$]. With GPx activity, two-way ANOVA revealed significant differences between the tests groups vs. the control groups, suggesting that TA treatment prevents the decrease in this enzyme induced by *icv*-STZ in the cerebral cortex [$F_{(1, 14)} = 28.28$; $p < 0.001$] and hippocampus [$F_{(1, 14)} = 31.89$; $p < 0.001$].

Serum glucose analysis

The peripheral glucose level was not affected by *icv*-STZ (Control: 114.8 ± 7.97 ; STZ: 139 ± 6.15 ; TA: 129.6 ± 11.04 ; TA-STZ: 139.4 ± 18.1).

4. Discussion

In this study we demonstrated that TA was effective in preventing SDAT in an *icv*-STZ model. TA prevents memory deficits, changes in AChE and NKA activities, and oxidative stress induced by STZ, which are symptoms associated with SAD. The *icv*-STZ [26], non-transgenic metabolic model, employs *icv* injection of a diabetogenic toxin in the rat lateral ventricles. The key mechanism in the development of disease is the brain insulin resistance, as well as in the human SAD [2]. Application of STZ leads to several brain metabolic and behavioral disturbances consequences of the decreased brain glucose utilization. This toxin also reduced ATP and energy charge potential in the cerebral cortex [27].

Behavioral disturbances induced by the SDAT model can be observed in the memory profile of the animals in the object recognition and Y-maze tests. In the object recognition test, TA prevented memory leaks induced by STZ as demonstrated by the animals' preference to explore the new object over familiar one; this shows interest in novelty, which is the behavior expected in a healthy animal [15]. Similarly, in the Y-maze test, treatment with TA demonstrated spatial memory preservation, as showed by the animals' preference to explore a novel arm over a familiar arm. The open field session revealed that neither STZ nor TA administration cause motor disabilities, excluding the possibility of their interference in the behavioral tests [14].

It is known that alkylating properties of STZ metabolites generate ROS, causing oxidative stress and affecting AChE activity, important enzyme in cognitive function [12]. We observed that TA was able to prevent the increase of AChE in the hippocampus and in the cerebral cortex induced by STZ. This finding is in accordance with previous study demonstrating an increase in AChE upon *icv*-STZ, 7 days after administration, without alteration in this enzyme expression [12]. Therefore, TA effect can be attributed, at least in part, to its potent antioxidant action, as data have demonstrated that oxidative stress plays a role in the regulation and activity of AChE [28].

Decreased activity and expression of NKA affects the signaling of neurotransmitters, impairing learning and memory and contributes to the anxious behavior of rats [29]. NKA inhibition increases N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) mediation, increasing nitric oxide (NO) synthesis by increasing nitric

oxide synthase activity (NOS) [30]. These observations are in accordance with our results when we observed an inhibition of the enzyme and an increase in the nitrite levels induced by STZ in both cerebral structures tested; treatment with TA prevented this effect, at least in part, owing to its antioxidant properties.

The NKA isoforms are expressed in a cell/tissue-specific manner; the $\alpha 1$ isoform is expressed in all mammalian tissue and cell types, $\alpha 2$ is present mostly in astrocytes, and $\alpha 3$ specifically in neurons [31]. Several diseases characterized by cognitive impairment, language disorder, mental retardation and psychiatric manifestations are associated with $\alpha 2$ and $\alpha 3$ abnormalities in the brain [32]. Our results showed that STZ decreased the activity of NKA $\alpha 1$ -3 in the cerebral cortex, and pretreatment with TA prevented this effect. In hippocampus, we observed that STZ only decreased the activity of NKA $\alpha 1$, and pretreatment with TA also prevented this effect.

We can suggest that NKA $\alpha 2,3$ remains unchanged in the hippocampus due the neuroprotection by autophagy in hippocampal neurons. The gene TSC1 (tuberous sclerosis complex) confers protection against ischemia during oxygen-glucose deprivation [33], which can be attributed to the reduction in brain glucose utilization induced by STZ. Considering that this neuroprotection occurs in hippocampal neurons, the $\alpha 3$ isoform was more favored by this mechanism than the $\alpha 1$ isoform. The differences in the responses in the cerebral cortex and the hippocampus also may be related to a spatial restriction of intracerebral damage caused by STZ injection into lateral ventricles suggesting that STZ have limitations of diffusion [34].

Free radical generation following *icv*-STZ occurs earlier than apoptosis and synaptic neurotoxicity. The oxidative stress leads to the modification of biomolecules and a loss of neurons mediating behavioral impairments and memory deficits in age-related neurodegenerative disorders [35]. Our findings demonstrated a significant increase in TBARS, nitrite, and ROS levels in *icv*-STZ rats, indicating neuronal damage caused by oxidative stress in the cerebral cortex and hippocampus. The brain tissue contains a lot of unsaturated fatty acids, which are especially vulnerable to free radical attacks [35]; so, the increase in TBARS induced by STZ can be attributed to an increase in nitrite and ROS levels due to *icv*-STZ.

In the natural antioxidant defenses activity our findings demonstrated a significant decrease in GPx, SOD and CAT activity in the cerebral cortex and a decrease in GPx activity in the hippocampus in *icv*-STZ rats indicating neuronal damage caused by oxidative stress. STZ did not alter SOD and CAT activities in the hippocampus and this can be attributed to a compensatory defense mechanism due the neuroprotection by autophagy and spatial restriction of intracerebral damage caused by STZ in hippocampus [33,34].

Being that the imbalance between antioxidant and free radicals in the body can cause neurodegenerative diseases, antioxidant substances play an important role in the prevention and cure of this disease [36]. Polymeric tannins such as TA are generally stronger against free radicals than small molecule polyphenols and have stronger inhibitory effects on lipid peroxidation than vitamin E, demonstrating a great neuroprotective potential [7]. In this study, chronic treatment with TA prevented the decrease of antioxidant enzyme activities induced by STZ, both in the cerebral cortex and in the hippocampus. Furthermore, TA prevented the increase of TBARS in cerebral structures, as well as the increase of ROS and nitrite levels in the hippocampus.

There has been a lot of evidenced demonstrating the relationship of ROS generation with neuronal degeneration, highlighting the importance of antioxidants, such as TA, in the treatment of neurodegenerative disorders like AD. In our study, TA was effective in ameliorating behavioral changes induced by STZ. These findings indicate that pretreatment with TA can prevent learning and memory impairment induced by STZ, demonstrating that TA can be an interesting strategy in the prevention of SAD.

Acknowledgments

The Brazilian research funding agencies FAPERGS, CNPq and CAPES (Finance code 001) supported this study.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest in this study.

References

- [1] Anand R *et al.* Therapeutics of Alzheimer's disease: past, present and future. *Neuropharmacology*. 2014; 76:27-50.
- [2] Grieb P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant. Mechanism *Mol Neurobiol*. 2016; 53:1741-1752.
- [3] Gonzalez-Gross M *et al.* Nutrition and cognitive impairment in the elderly. *Br J Nutr*. 2001; 86:313-321.
- [4] Bastianetto S *et al.* Neuroprotective effects of green and black teas and their catechingallate esters against beta-amyloid-induced toxicity. *Eur J Neurosci*. 2006; 23:55-64.
- [5] Serrano J *et al.* Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol Nutr Food Res*. 2009; 53:310-329.
- [6] Braidy N *et al.* Molecular targets of Tannic Acid in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2017; 14:861-869.
- [7] Ono K *et al.* Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's β -amyloid fibrils *in vitro*. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1690:193-202.
- [8] Mori T *et al.* Tannic acid is a natural β -secretase inhibitor that prevents cognitive impairment and mitigates Alzheimer-like pathology in transgenic mice. *J Biol Chem*. 2012; 287:6912-6927.

[9] Yao J *et al.* Molecular Hairpin: A possible model for inhibition of tau aggregation by Tannic Acid. *Biochemistry*. 2013; 52:1893-1902.

[10] Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci*. 1998; 112:1199-1208.

[11] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego, 1986.

[12] Gutierrez JM *et al.* Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. *Life Sci*. 2014; 96:7-17.

[13] Walsh RN, Cummins RA. The open-field test: a critical review. *Psychol Bull*. 1976; 83:482-504.

[14] Dere, E, Huston JP, Silva MAS. Integrated memory for objects, places, and temporal order: Evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiol Learn Mem*. 2005; 84:214-221.

[15] Dellu F, Fauchey V, LeMoal M, *et al.* Extension of a new two-trial memory task in the rat: influence of environmental context on recognition processes. *Neurobiol Learn Mem*. 1997; 67:112-120.

[16] Ellman GL, Courtney KD, Andres V, *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961; 7:88-95.

[17] Fiske CH, Subbarow Y. The Nature of the Inorganic Phosphate in Voluntary Muscle. *Science*. 1927; 65:401-403.

[18] Rambo LM *et al.* Creatine increases hippocampal Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-ATPase activity via NMDA-calcineurin pathway. *Brain Res Bull*. 2012; 88:553-559.

[19] Ohkawa H *et al.* Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979; 95:351-358.

[20] Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes on the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2001; 302:141-145.

[21] Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med*. 1989; 169:1543-1555.

[22] Ali SF *et al.* Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 1992; 13:637-648.

[23] Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol*. 1984; 105:121-126.

[24] Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972; 247:3170-3175.

[25] Lowry OH *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193:265-275.

[26] Salkovic-Petrisic M *et al.* What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the

therapeutic strategies in Alzheimer's research. *J Neural Transm.* 2013; 120:233-252.

[27] Duelli R *et al.* Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. *Int J Dev Neurosci.* 1994; 12:737-743.

[28] Biasibetti R *et al.* Green tea (-) epigallocatechin-3-gallate reverses oxidative stress and reduces acetylcholinesterase activity in a streptozotocin-induced model of dementia. *Behav Brain Res.* 2013; 236:186-193.

[29] Moseley AE *et al.* Deficiency in Na, K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity and anxiety in mice. *J Neurosci.* 2007; 27:616-626.

[30] Zhang L *et al.* Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase inhibition upregulates NMDA-evoked currents in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Fundam Clin Pharmacol.* 2012; 26:503-512.

[31] Blanco G. Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue specific ion regulation. *Semin Nephrol.* 2005; 25:292-303.

[32] Isaksen TJ, Lykke-Hartmann K. Insight into the Pathology of the $\alpha 2$ -Na⁺/K⁺ ATPase in Neurological Disorders; Lessons from Animal Models. *Front Physiol.* 2016; 7:161.

[33] Papadakis M *et al.* Tsc1 (hamartin) confers against ischemia by inducing autophagy. *Nat Med.* 2013; 19:351-357.

[34] Terwel D *et al.* Brain enzyme activities after intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats receiving acetyl-L-carnitine. *Eur J Pharmacol.* 1995; 287:65-71.

[35] Sharma M, Gupta YK. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. *Life Sci.* 2001; 68:1021-1029.

[36] Tan HP *et al.* Neuroprotective activity of galloylated cyanogenic glucosides and hydrolysable tannins isolated from leaves of *Phyllagathis rotundifolia*. *Fitoterapia.* 2012; 83:223-229.

Figure Captions

Fig 1 Scheme of experimental design

Fig 2 Effect of tannic acid treatment and *icv*-STZ on object recognition, Y-maze and open field test. (A) Exploratory preference (percentage of total time spent in exploration of new object) on object recognition (10-14 rats per group). (B) Exploratory preference (percentage of total time spent in exploration of novel arm) on Y- maze task (8-10 rats per group). (C) Number of crossings in open field test (13-14 rats for group). Data are reported as mean $\pm$ SEM. CTRL= control; TA= tannic acid; STZ= streptozotocin; TA-STZ= tannic acid-stz. $^{\#}p<0.05$, $^{\#\#}p<0.01$ vs. CTRL; $^*p<0.05$, $^{**}p<0.01$ vs. STZ. ANOVA (two-way) followed by Bonferroni test

Fig 3 Effect of tannic acid treatment and *icv*-STZ on acetylcholinesterase (AChE) activity in the cerebral cortex (A) and hippocampus (B). Data are reported as mean $\pm$ SEM with 4-8 rats for a group. CTRL= control; TA= tannic acid; STZ= streptozotocin; TA-STZ= tannic acid-stz. $^{\#}p<0.05$, $^{\#\#}p<0.01$ vs. CTRL; $^*p<0.05$ and $^{***}p<0.001$ vs. STZ. ANOVA (two-way) followed by Bonferroni test

Fig 4 Effect of tannic acid treatment and *icv*-STZ on the ATPase activity in supernatant fraction from cerebral cortex of rats. (A) total ATPase, (B) Na^+, K^+ -ATPase, (C) $\alpha 2, 3\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, (D) $\alpha 1\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Data are reported as mean $\pm$ SEM with 4-6 rats for a group. CTRL= control; TA= tannic acid; STZ=

streptozotocin; TA-STZ= tannic acid-stz. # $p<0.05$, ## $p<0.01$ vs. CTRL; * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. STZ. ANOVA (two-way) followed by Bonferroni test

Fig 5 Effect of tannic acid treatment and *icv*-STZ on the ATPase activity in supernatant fraction from hippocampus of rats. (A) total ATPase, (B) Na⁺,K⁺-ATPase, (C) α2,3Na⁺,K⁺-ATPase, (D) α1Na⁺,K⁺-ATPase. Data are reported as mean ± SEM with 4-6 rats for a group. CTRL= control; TA= tannic acid; STZ= streptozotocin; TA-STZ= tannic acid-stz. # $p<0.05$ vs. CTRL; * $p<0.05$ vs. STZ. ANOVA (two-way) followed by Bonferroni test

Table 1. Effect of tannic acid treatment and *icv*-STZ on oxidative stress markers: TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances), SH (total thiol content), nitrite content, ROS (reactive oxygen species).

Groups	TBARS		SH		Nitrite		ROS	
	(nmol TBARS/mg protein)		(nmol TNB/mg protein)		(μmol nitrite/mg protein)		(μmol DCF/mg protein)	
	Cortex	Hippocampus	Cortex	Hippocampus	Cortex	Hippocampus	Cortex	Hippocampus
CTRL	0.82± 0.20	1.11±0.1	152.42±25.02	282.15±11.82	8.78±1.58	7.14±1.48	34.38±3.86	33.89±1.63
TA	0.84±0.06	1.16±0.08	129.55±8.63	228.05±20.75	10.41±1.34	9.33±1.01	40.34±5.98	44.61±5.8
STZ	1.26±0.21 ^{##}	1.68±0.17 [#]	117.01±13.51	214.85±26.71	12.22±1.41 [#]	10.37±1.53 [#]	49.66±5.39 [#]	56.27±6.5 ^{##}
TA-STZ	0.81±0.11 ^{**}	1.01±0.07 ^{**}	120.62±10.04	247.21±30.39	11.45±1.98 [#]	9.31±1.99 [*]	49.14±7.91 [#]	45.21±7.63 [*]

Data are reported as means ± SEM. with 4-8 rats for a group. [#] $p<0.05$, ^{##} $p<0.01$ vs. CTRL; ^{*} $p<0.05$, ^{**} $p<0.01$ vs. STZ. ANOVA (two-way) followed by Bonferroni test.

Table 2. Effect of tannic acid treatment and *icv*-STZ on antioxidant enzymes: SOD (superoxide dismutase), CAT (catalase) and GPx (glutathione peroxidase).

Groups	SOD (units/mg protein)		CAT (units/mg protein)		GPx (units/mg protein)	
	Cortex	Hippocampus	Cortex	Hippocampus	Cortex	Hippocampus
CTRL	28.97±1.12	24.41±1.09	2.28±0.15	2.02±0.08	22.98±1.47	33.13±1.98
TA	24.83±2.32	22.76±1.23	1.95±0.28	1.72±0.05	19.29±1.09	27.02±1.26
STZ	14.32±2.03 ^{###}	23.78±1.16	1.46±0.11 [#]	1.90±0.05	13.09±1.16 ^{##}	15.85±1.37 ^{###}
TA-STZ	24.74±2.15 ^{**}	26.93±1.17	2.32±0.30 [*]	1.87±0.22	24.62±1.63 ^{***}	30.74±2.35 ^{***}

Data are reported as means ± SEM. with 4-8 rats for a group. [#] $p < 0.05$, ^{##} $p < 0.01$, ^{###} $p < 0.001$ vs. CTRL; ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$ vs. STZ. ANOVA (two-way) followed by Bonferroni test.

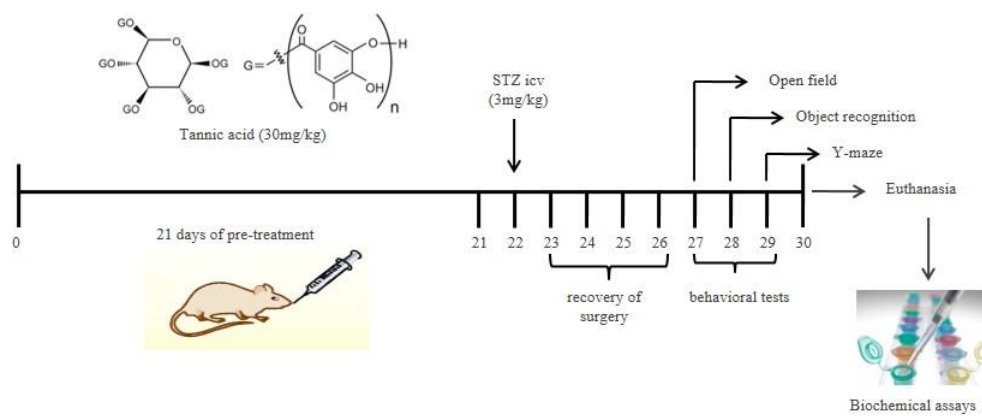
Figure 1

Figure 2

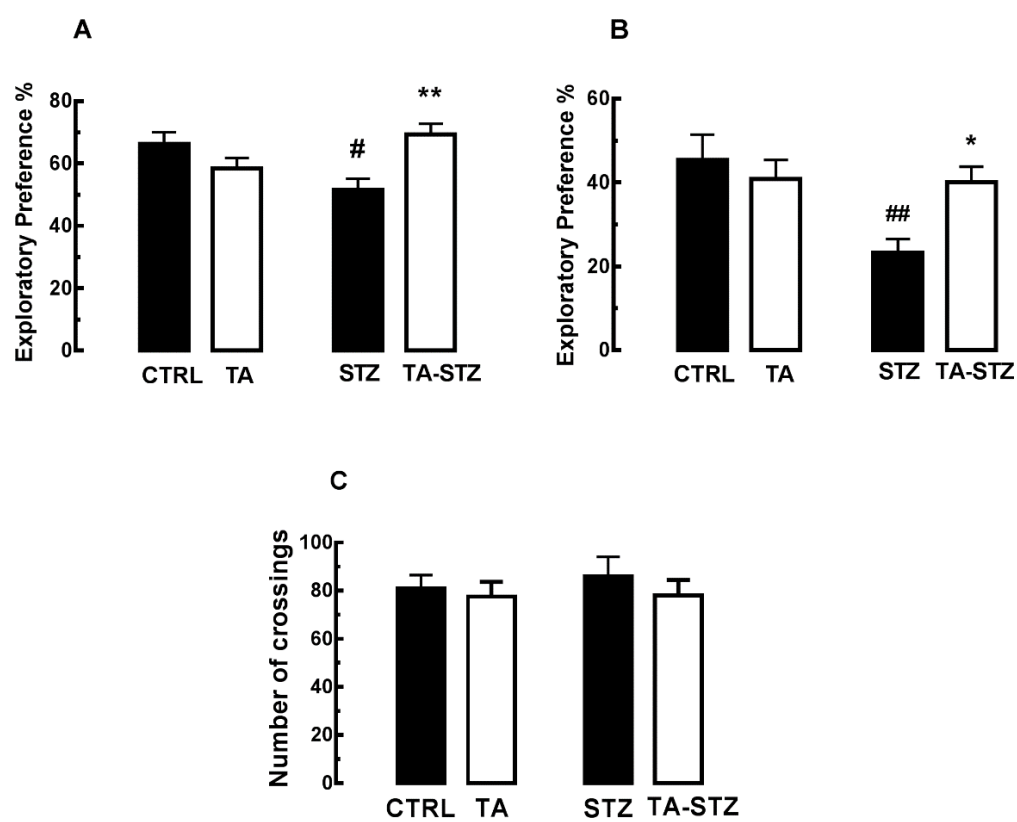


Figure 3

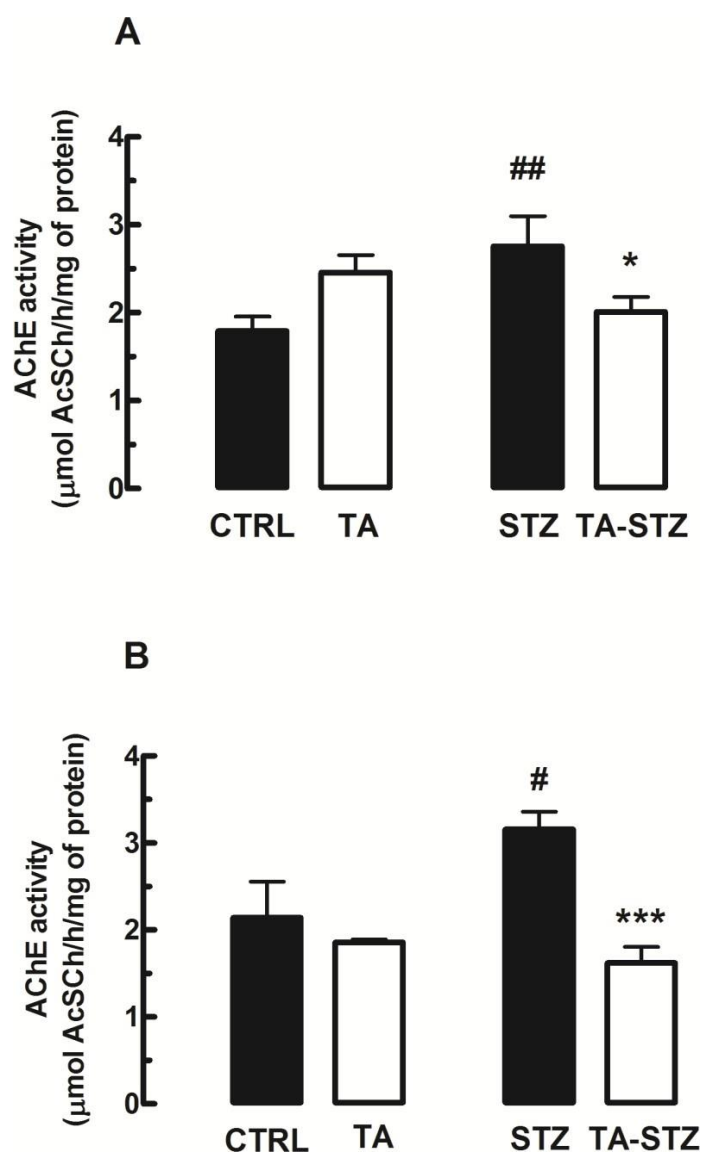


Figure 4

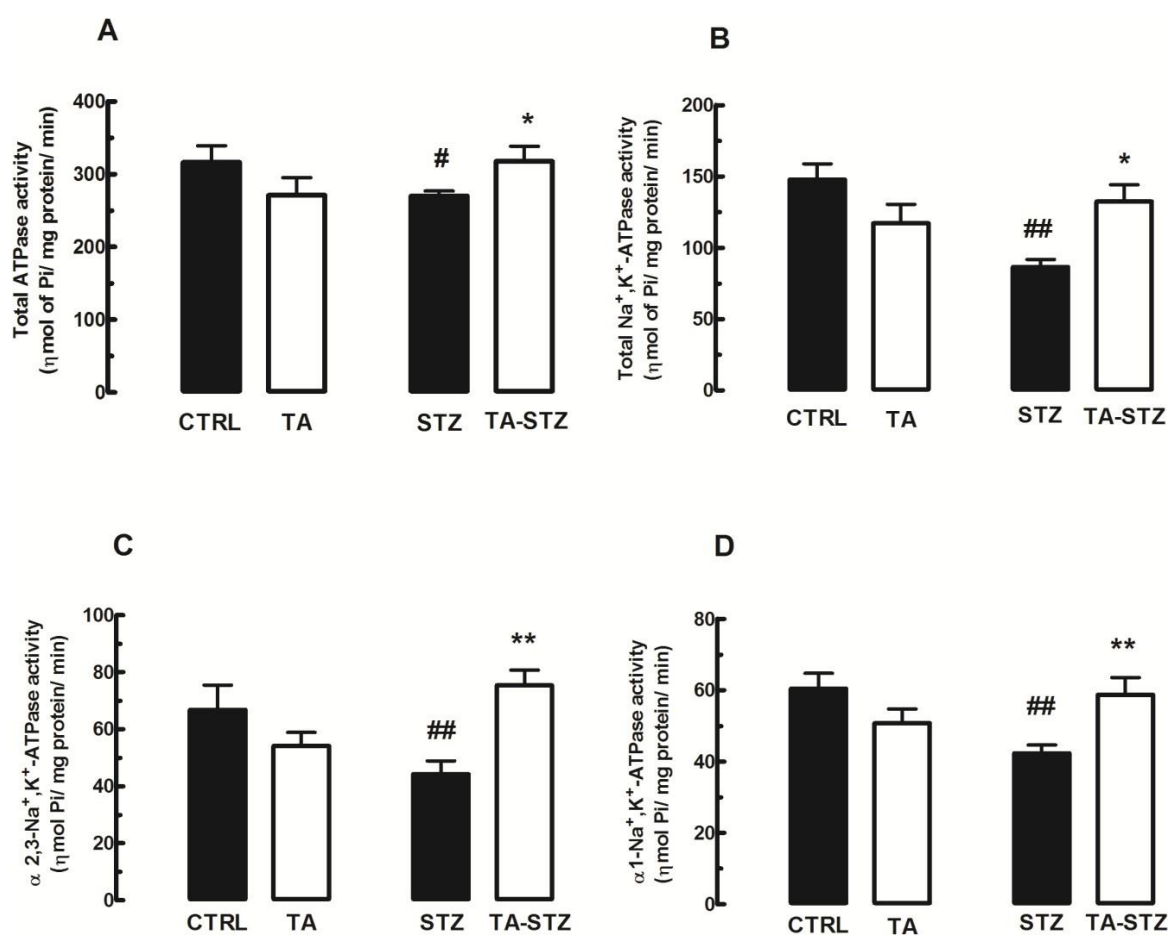
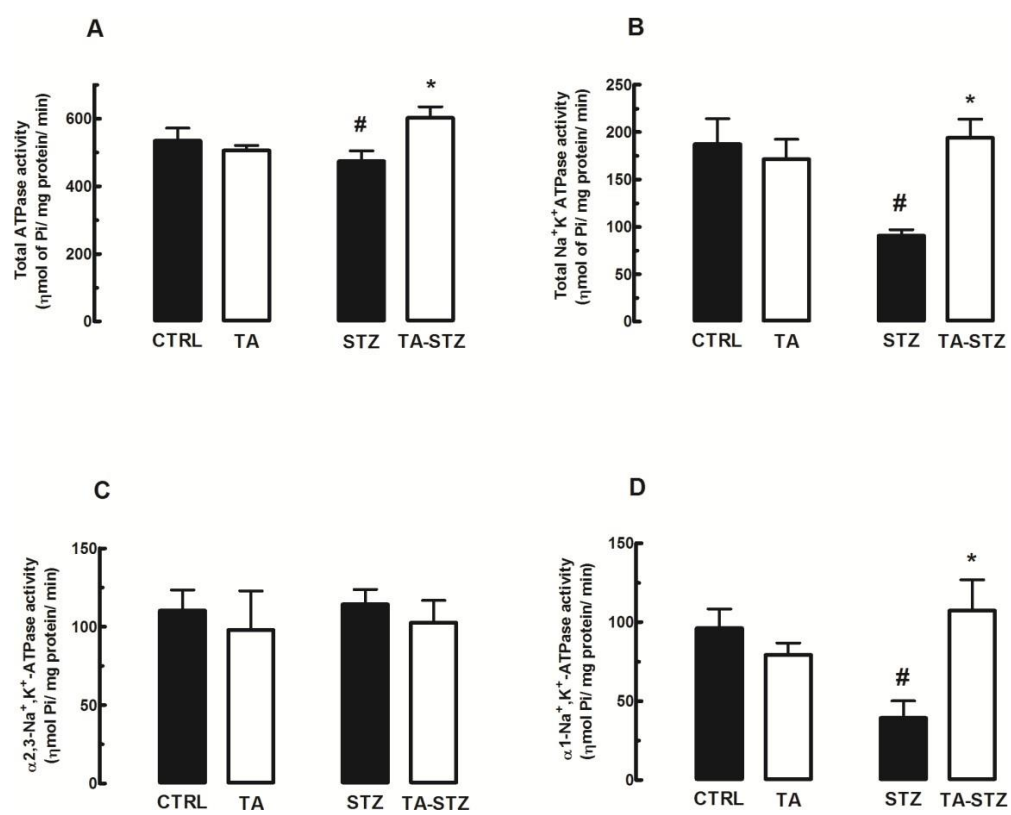


Figure 5



5. Manuscrito

Manuscrito submetido ao periódico internacional *Neurotoxicity Research*

Tannic acid ameliorates STZ-induced AD-like impairment of memory, neuroinflammation, and neuronal death, and modulates the PI3K-Akt signaling pathway

Mariana F. B. Gerzson^a; Natália P. Bona^a; Mayara S. P. Soares^b; Fernanda C. Teixeira^b; Francine L. Rahmeier^c; Fabiano B. Carvalho^c; Marilda da Cruz Fernandes^c; Giovana Onzi^d; Guido Lenz^d; Relber A. Gonçalves^e; Roselia M. Spanevello^{b*}; Francieli M. Stefanello^{a*}

^aLaboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brazil.

^bLaboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brazil.

^cLaboratório de Pesquisa em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rua Sarmento Leite, 245, Porto Alegre, RS, Brazil.

^dLaboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

^eLaboratório de Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

***Address reprint requests to:** Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, CEP 96160-000, Capão do Leão, RS, Brazil. Phone: +55 53 32757355

Email addresses:

Francieli Moro Stefanello; fmstefanello@gmail.com

Roselia Maria Spanevello; rspanevello@gmail.com

Abstract

Tannic acid (TA) is a hydrolysable glycosidic polyphenol polymer of gallic acid, which possesses neuroprotective properties. The aim of this study was to evaluate the effect of TA treatment on cognitive performance and neurochemical changes in an experimental model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT) and to explore the potential mechanisms underlying this. Adult male rats were divided into four groups: control (1 mL/kg water, once daily, by gavage), TA (30 mg/kg, once daily, by gavage), streptozotocin (STZ) (3 mg/kg, intracerebroventricular), and STZ *plus* TA. Cognitive deficits (short-term memory), neuronal survival, neuroinflammation, expression of the presynaptic marker SNAP-25 and modulation of the PI3K/Akt signaling pathway in the cerebral cortex were all evaluated. TA treatment protected against the impairment of memory in STZ-induced SDAT. STZ promoted increases in neuronal death and the levels of proinflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α), and a decrease in PI3K-Akt signaling; TA was able to restore these changes. Neither STZ nor TA altered SNAP-25 expression or the levels of IL-12 and IL-4 in the cerebral cortex. Our study highlights that treatment with TA prevents both memory deficits and impaired PI3K-Akt signaling, and protects against neuronal death and neuroinflammation in STZ-induced SDAT in rats.

Keywords: tannic acid; dementia; streptozotocin; PI3K-Akt signaling; cytokines; cerebral cortex

1. Introduction

Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disease with cognitive and neuropsychiatric manifestations that result in progressive impairment of the mental and behavioral capabilities of the patient, leading to incapacitation. It accounts for more than 80% of dementia cases in older people worldwide, affecting an estimated 35 million individuals [1-4]. Sporadic AD is multifactorial and accounts for the majority of cases of this disease [5,6].

A number of histopathological features are present in the cerebral parenchyma of patients with AD. These include deposits of amyloid fibrils which are associated with a variety of different types of senile plaques, the accumulation of abnormal filaments of the tau protein and consequent formation of neurofibrillary tangles, neuronal and synaptic loss, oxidative stress, glial activation, and inflammation, all of which are observed in the brain regions responsible for cognitive functions [4]. Several abnormalities have also been observed in the brain glucose metabolism of patients with sporadic AD [7,8]. It has therefore been suggested that a primary disorder of neuronal insulin and impaired transduction of the insulin receptor may also contribute to the development of dementia [9,10].

Intracerebroventricular (ICV) injection of streptozotocin (STZ) is a model which is widely used to mimic some aspects of sporadic AD. STZ inhibits the function of the insulin receptor in the brain, disrupting the metabolism of glucose and energy [11], and leading to progressive deterioration of cognitive function [9].

Many studies in the literature have focused on the therapeutic potential of natural compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. Notably, the high content of polyphenols present in some plants may positively influence the pathology of AD [12-15]. TA is a hydrolysable glycosidic polyphenol polymer of gallic acid which possesses neuroprotective properties [16,17]. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the neuroprotective effects of TA in a STZ-induced rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT) and to investigate the mechanisms underlying the effects of this natural compound.

2. Materials and methods

Animals

Adult male Wistar rats, weighing 300-350 g, were obtained from the Federal University of Pelotas. These rats were group housed in polyacrylic cages with no more than four animals per cage and maintained under standard laboratory conditions with a natural light/dark cycle. They were allowed free access to standard dry rat food and tap water. All procedures were carried out according to the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals. This work was approved by the Ethical Committee of Animal Experimentation of the institution (CEEA 4611-2015).

Drug, experimental and surgical protocols

TA and STZ were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Luis, MO, USA) and prepared in water and citrate (pH 4.4) buffers, respectively. TA or water was administered by gavage for 21 days at a dose of 30 mg/kg b.w. [17]. On the 22th day, animals were anesthetized using ketamine/xylazine (80/10 mg/kg, intraperitoneal), placed into a stereotaxic frame with specially designed nose and ear bars (Insight Ltda, SP, Brazil) and received bilateral ICV injections of 5 μ L/site of STZ (3 mg/kg b.w.) or citrate buffer [18,19] into the lateral ventricles. The injection was performed using a Hamilton syringe according to the following coordinates: antero-posterior -0.8 mm, lateral 1.5 mm and dorso-ventral -4.0 mm relative to the bregma and ventral from the dura, with the tooth bar set at 0 mm [20]. After three days of surgical recovery, behavioral tests were conducted and oral treatment by gavage was resumed. On the 30th day, animals were euthanized by decapitation or transcardial perfusion, and their brains were removed for the determination of biochemical parameters.

Behavioral procedures

Open-field test

Spontaneous locomotor activity was assessed following recovery from surgery. Animals were observed over a period of 5 min and the number of segments crossed with four paws was recorded [21].

Inhibitory avoidance task

Memory retention deficits were evaluated by a step through passive avoidance test conducted one day after the open-field test [22]. First, the animals were subjected to training using step-down inhibitory avoidance apparatus. Each rat was placed gently onto the platform facing the rear left corner, and when they stepped down onto the grid with all four paws, a 3-s 0.4-mA shock was applied to the grid. A retention test then took place using the same apparatus 3 h later. Test step-down latency was used as a measure of retention, and a cut-off time of 300 s was utilized.

Histological procedures and immunohistochemical techniques

On the 30th day of the experiment, animals were euthanized by transcardial perfusion. Rats were anesthetized with isoflurane and perfused with 0.9% saline for 10 min, followed by 4% paraformaldehyde diluted in phosphate buffered saline (PBS 0.1 M, pH 7.2-7.4) for 30 min. The brains were removed and stored for 24 h in 4% buffered paraformaldehyde followed by 70% ethanol for at least 24 h. Following this, the brain samples were embedded in paraffin. Coronal sections were cut using a rotary microtome (5- μ m thickness) in the frontal cortex. Six sections were used for the analysis, with a distance of 50 μ m between each cut.

After storage for 30 min at 80°C, sections were prepared for cresyl violet staining and NeuN-targeted immunohistochemistry. Sections were cleared using xylene (10 min, 5 min, and 5 min), and then dehydrated using ethanol 100% (5 min), 95% (5 min), 70% (5 min), 50% (5 min), and distilled water. Following this, the sections were rehydrated in PBS (pH 7.4) with 0.5% Triton X-100 (PBS-TX) for 15 min, and then incubated in a citrate buffer (pH 6.0) for 20 min at 98 °C. Endogenous peroxidase was blocked using 5% hydrogen peroxide (30V) in methanol for 10 min (3 times). Nonspecific proteins were blocked using 1% BSA (Sigma®, Sigma-Aldrich, Brazil) in PBS-TX for at least 1 h at 25 °C. The sections were then incubated with primary monoclonal anti-NeuN 3 antibodies (1:1000 dilution, Merck Milipore, Burlington, Massachusetts, EUA) for 1 h at 25 °C and overnight at 4 °C. After 3× 15 min PBS washes, sections were then incubated with conjugated secondary antibodies (polymer

reveal HRP conjugate) (1:1000 dilution, Sring Bioscience, CA, EUA) for 40 min. Finally, the immunohistochemical reaction was revealed with 0.06% 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Dako® Carpinteria, CA, EUA) in PBS-TX for 5 min and mounted on slides using Entellan® (Merck®, Brazil). NeuN-positive cells were visualized in the frontal cortex. The number of NeuN-positive cells in a $10.083 \times 150 \mu\text{m}^2$ square was counted using Image Pro Plus® version 6.3 (Media Cybernetics® software) (Rockville, USA).

Neuronal morphology in the frontal cortex sections was evaluated using cresyl violet staining of Nissl bodies, as previously described [23]. The sections were incubated for 10 min with cresyl violet solution (0.5% in acetate buffer). These were subsequently washed twice with acetate buffer, twice in 100% ethanol, cleared with xylene, and mounted with DPX medium (Sigma-Aldrich, Brazil).

Western blot analysis

Analysis of protein levels was performed as described previously [24]. Three rats in each group were euthanized. Cortical tissues were then macerated with a RIPA buffer suitable for extracting the proteins to be quantified [25]. The homogenate was centrifuged at 12,000 rpm for 15 min at 4 °C. Thirty μg protein extracts were separated on a 15% SDS-PAGE gel followed by electroblotting onto a PVDF membrane (Millipore, IPVH00010). After this transfer, the membranes were stained with Coomassie R-250, to verify transfer quality, and the image of a representative band was used as loading control [26]. The membranes were blocked with a milk powder solution and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies (1:1000) of interest: Akt (pan) (C67E7) (#4691 - Cell Signalling, Beverly, MA), phospho-Akt (p-Akt) (Ser 473) (#9271 - Cell Signalling, Beverly, MA) and SNAP 25 (4E203) (sc-73044 - Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, EUA). Secondary antibodies (1: 2000) were incubated for 2 h to detect the primary antibodies: anti-rabbit IgG HRP-linked (#7074 Cell Signalling, Beverly, MA) to Akt and p-Akt and anti-mouse IgG-HRP (sc-2005 -Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, EUA) to SNAP-25. This was followed by exposure to ECL and X-ray films (Kodak-Xmat). The optical densities of the bands were obtained and quantified using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Quantification of cytokines

Supernatants of the cerebral cortex were analyzed in order to detect their levels of TNF- α , IL-6, IL-12, and IL-4. These cytokines were detected by an enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) using an OptEIA kit (Pharmingen, SanDiego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Standard curves allowed the determination of cytokine concentrations in pg/mL. The absorbance was read at 450 nm using a microplate scanning spectrophotometer.

Statistical analysis

Values are presented as mean $\pm$ S.E.M. Behavioral data were not normally distributed and thus the Kruskal-Wallis test was employed in the analysis. Neurochemical parameters were analyzed by one-way ANOVA and the *post-hoc* Tukey test was utilized when appropriate. A *P* value <0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7.0 software.

3. Results

Behavioral tests

Effect of TA and STZ treatment in memory of rats

Fig. 1 shows the effect of TA treatment on STZ-induced memory deficits in the inhibitory avoidance task. Treatment with TA prevented STZ-induced impairment of memory [$H [3] = 22.94$; $P < 0.001$]. Statistical analysis of the data obtained during training showed no difference between experimental groups (data not shown).

The open field test showed that neither STZ or TA altered the number of crossings observed, suggesting that neither caused gross motor disabilities in this task (data not shown).

Effect of TA and STZ treatment in the number of cells in the prefrontal cortex of rats

Fig. 2 A and B show the effect of TA and STZ on the number of NeuN-positive cells, determined using immunohistochemistry, and on neuronal morphology, evaluated by cresyl violet staining. Statistical analysis showed a

significant reduction in the number of cells in the prefrontal cortex in the STZ group compared to the control group in both NeuN [$F(3, 14) = 5.376$; $P < 0.05$] and cresyl violet staining [$F(3, 19) = 4.391$; $P < 0.05$]. TA administration, however, was shown to prevent these alterations.

Effect of TA and STZ treatment on Akt, pAkt and SNAP-25 levels in the cerebral cortex of rats

Western blotting analyses was used to investigate the effect of TA and STZ on SNAP-25 levels in the cerebral cortex of rats, and no significant differences between the groups were observed [$F(3, 9) = 1.82$; $P > 0.05$] (Fig 3A). Statistical analysis showed a significant reduction in Akt and pAkt levels in the STZ group compared to the control group. However, TA administration was shown to prevent the reduction of both Akt [$F(3, 8) = 10.58$; $P < 0.01$] and pAkt [$F(3, 8) = 60.08$; $P < 0.001$] levels (Fig 3B and C).

Effect of TA and STZ treatment on cytokines levels in the cerebral cortex of rats

Fig. 4A and B show the effect of TA and STZ treatment on cerebral cortex TNF- α and IL-6 levels. Statistical analysis showed a significant increase in TNF- α [$F(3, 12) = 25.46$; $P < 0.001$] and IL-6 [$F(3, 14) = 16.38$; $P < 0.001$] levels in the STZ group compared to the control group. However, TA administration was shown to prevent this increase.

Fig. 4C and D show the effect of TA and STZ treatment on cerebral cortex IL-12 and IL-4 levels. No significant differences between the groups were observed in IL-12 [$F(3, 19) = 3.31$; $P > 0.05$] or IL-4 [$F(3, 19) = 2.39$; $P > 0.05$] levels.

4. Discussion

In this study, we investigated the neuroprotective potential of TA in a STZ-induced rat model of SDAT. Acute responses in memory alterations, neuronal loss, inflammation, and signaling pathway markers were all evaluated, given that this model promotes alterations similar to those found in patients with AD [27-29].

The inhibitory avoidance task uses an aversive stimulus to assess emotional memory, which is involved in situations in which fear/anxiety is felt. In rodents, a fear of predators and a harmful stimulus such as a foot-shock are both considered aversive stimuli [30]. Our results demonstrated that STZ impairs memory acquisition (short-term memory) in the inhibitory avoidance task. In the step-down inhibitory avoidance task, rodents associate a shock to the foot with stepping down from the elevated platform, and thus the conditioned response is to refrain from stepping down [31]. No difference was observed between groups in the open field test, excluding the possibility that STZ interferes with locomotor activity and as a result impairs the ability to step down from the platform. These findings are in accordance with previous studies that have utilized this rodent model [19,32,33]. Treatment with TA was shown to protect against the short-term memory deficits induced by ICV-STZ in the step-down inhibitory avoidance task. Corroborating our findings, other researchers have previously demonstrated that TA prevents cognitive impairment in PSAPP mice (transgenic mice models of dementia-like AD) [17].

During memory consolidation, protein synthesis is required to transform newly learned information acquired during the acquisition phase into stable behavioral modifications [34]. The aversive stimulus in the step-down inhibitory avoidance task can be classified into either a moderate (0.5 mA up to 10 s) or intense (1.5 mA for 2 s) foot-shock, and the consolidation of both forms of aversive experience is protein synthesis-dependent in the medial prefrontal cortex. However, protein synthesis in the amygdala and dorsal hippocampus is essential only for the consolidation of an intense form of aversive experience [30]. In our study, rats were given a moderate foot-shock (0.4 mA up to 3 s), so the cerebral cortex was studied in an attempt to understand the neuroprotective mechanism of TA demonstrated in the inhibitory avoidance task.

Histopathological evaluation of the cerebral cortex showed that ICV-STZ reduced the number of surviving neurons - the numbers of cresyl violet- and NeuN-positive neurons were significantly lower in the STZ group compared to the control group. Accordingly, previous studies investigating hippocampal morphological changes using cresyl violet staining have already demonstrated that STZ leads to neuronal damage in the brain [35-37]. This neuronal degeneration leads to synaptic impairment in the brain regions responsible for

cognitive functions, including the cerebral cortex and hippocampus, thus directly affecting memory. Data from the literature have demonstrated that neuronal loss is associated with memory impairment in the passive avoidance task [35,36]. Therefore, the significant memory deficits observed here in the ICV-STZ rats in the passive avoidance task can be, at least in part, attributed to the reduced number of surviving neurons demonstrated in the histopathological evaluation. However, TA significantly prevented ICV-STZ-induced neuronal loss and ICV-STZ-induced impairment of memory in the passive avoidance task.

Neuroinflammation, characterized by the presence of reactive astrocytes and microglia, and oxidative stress are both considered hallmarks of AD, playing crucial roles in neurotoxicity [38,39]. Several studies support the neuroprotective potential of polyphenolic compounds, for example green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate, resveratrol, and curcumin. This neuroprotective effect has been attributed to their antioxidant properties and ability to suppress neuroinflammation. The neuroprotective abilities of polyphenolic compounds promote memory, learning and cognitive functions, identifying these compounds as interesting potential therapeutic agents against AD [13-15]. In our study, TA, a polyphenolic compound, significantly prevented the increase in IL-6 and TNF- α levels induced by ICV-STZ. Therefore, TA demonstrated anti-neuroinflammatory activity which was responsible, at least in part, for the neuroprotection against STZ-induced cell death and memory impairment. This beneficial effect is in accordance with previous studies that have demonstrated that TA exhibits anti-inflammatory activity [17].

Cytokines are small signaling proteins that are involved in every aspect of neuroinflammation. Elevated levels of proinflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- α , contribute towards the progression of neurological disorders and are considered biomarkers for AD [40-42]. In studies of the ICV-STZ model, the most prominent brain abnormality observed was neuroinflammation [43], and indeed our findings similarly demonstrate that STZ increased IL-6 and TNF- α levels. Neither TA nor STZ induced changes in the levels of the anti-inflammatory cytokines IL-12 and IL-4.

The molecular mechanism underlying TA's neuroprotective activity was investigated here through evaluation of the PI3K/Akt signaling pathway, which plays a pivotal role in neuronal survival and is downregulated in the AD brain

[44,45]. Some authors have shown that the development of brain insulin resistance and consequent reduction of PI3K-Akt signaling activity, glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) overactivation and decreased levels of brain glucose transporters are key mechanisms in the development of AD, leading to neurofibrillary degeneration [10,43]. In accordance with this, our results showed that STZ decreased Akt and pAkt levels in the cerebral cortex. TA prevented these changes, maintaining the levels of both Akt and pAkt. Therefore, we suggest that TA promotes adequate functioning of the PI3K/Akt signaling pathway, which is essential for promoting neuronal survival [46].

Additionally, several proteomic alterations have been linked to the pathophysiology of AD, such as the reduction of SNAP-25 protein expression [47]. SNAP-25 protein is a component of the SNARE complex which plays a crucial role in the exocytosis of calcium-dependent synaptic vesicles, ensuring the efficient release of neurotransmitters and the propagation of action potentials. The key role of SNAP-25 is to initiate this exocytosis by ensuring neuronal survival. The SNARE complex is therefore involved in the processes of learning, locomotion, memory formation, and ultimately the normal functioning of the brain as a whole. Since optimal levels of SNAP-25 are required for neurotransmission, any changes in its expression may lead to, or accompany, a number of neurological disorders, including AD [47]. In this work, neither STZ nor TA altered presynaptic SNAP-25 expression. The pathological alterations observed in the STZ model are known to be time-dependent. Up to one month after injection is considered the acute response phase, and this may therefore explain the unaltered SNAP-25 expression observed in our experiment [29].

In conclusion, the present study demonstrated that TA treatment protected against memory deficits in an experimental model of STZ-induced SDAT. These neuroprotective effects may be related to its anti-inflammatory activity and modulation of the PI3K/Akt signaling pathway in the cerebral cortex.

Acknowledgments

The Brazilian research funding agencies FAPERGS, CNPq, CAPES (Finance code 001) supported this study.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest in this study.

References

- [1] Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP (2013) The global prevalence of dementia: a systematic review and meta-analysis. *Alzheimers Dement* 9:63-75.
- [2] Anand R, Gill KD, Mahdi AA (2014) Therapeutics of Alzheimer's disease: past, present and future. *Neuropharmacol* 76:27-50.
- [3] Cauwenberghe CV, Broeckhoven CV, Sleegers K (2016) The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genet Med* 18:421-430.
- [4] Kumar A, Ekavali AS (2015) A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep* 67:195-203.
- [5] Mayeux R, Stern Y (2012) Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:1-18.
- [6] Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, Van der Flier WM (2016) Alzheimer's disease. *Lancet* 388:505-517.
- [7] Hoyer S (2004) Causes and consequences of disturbances of cerebral glucose metabolism in sporadic Alzheimer disease: therapeutic implications. *Adv Exp Med Bio* 541:135-152.
- [8] Hoyer S (2004) Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *Eur J Pharmacol* 490:115-125.

- [9] Lannert H, Hoyer S (1998) Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci* 112:199-208.
- [10] Deng Y, Li B, Liu Y, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX (2009) Dysregulation of insulin signaling, glucose transporters, OGlcNAcylation, and phosphorylation of tau and neurofilaments in the brain: implication for Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 175:2089-2098.
- [11] Sharma M, Gupta YK (2001) Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. *Life Sci* 68:1021-1029.
- [12] Choi DY, Lee YJ, Hong JT, Lee, HJ (2012) Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 87:144-153.
- [13] Ahmed T, Javed S, Javed S, Tariq A, Šamec D, Tejada S, Nabavi SF, Braidy N, Nabavi SM. (2017) Resveratrol and Alzheimer's Disease: Mechanistic Insights. *Mol Neurobiol* 54:2622-2635.
- [14] Bassani TB, Turnes JM, Moura ELR, Bonato JM, Cóppola-Segovia V, Zanata SM, Oliveira RMMW, Vital MABF (2017) Effects of curcumin on short-term spatial and recognition memory, adult neurogenesis and neuroinflammation in a streptozotocin-induced rat model of dementia of Alzheimer's type. *Behav Brain Res* 29:41-54.
- [15] Mattioli R, Francioso A, d'Erme, Trovato M, Mancini P, Piacentini L, Casale AM, Wessjohann L, Gazzino R, Costantino P, Mosca L (2019) Anti-

Inflammatory Activity of A Polyphenolic Extract from *Arabidopsis thaliana* in In Vitro and In Vivo Models of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*, 20:708-727.

[16] Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura AM, Saura-calixto F (2009) Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol Nutr Food Res* 53:310-329.

[17] Mori T, Rezai-Zadeh K, Koyama N, Arendash G, Yamaguchi H, Kakuda N, Horikoshi-Sakuraba Y, Tan J, Town, T (2012) Tannic Acid is a natural β -secretase inhibitor that prevents cognitive impairment and mitigates Alzheimer-like pathology in transgenic mice. *J Biol Chem* 287:6912-6927.

[18] Tiwari V, Kuhad A, Bishnoi M, Chopra K (2009) Chronic treatment with tocotrienol, an isoform of vitamin E, prevents intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive impairment and oxidative-nitrosative stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 93:183-189.

[19] Gutierrez JM, Carvalho FB, Schetinger MRC, Marisco P, Agostinho P, Rodrigues M, Rubin MA, Schmatz R, Da Silva CR, Cognato GP, Farias JG, Signor C, Morsch VM, Mazzanti CM, Bogo M, Bonan CD, Spanevello R (2014) Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. *Life Sci* 96:7-17.

[20] Paxinos G, Watson C (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.

[21] Walsh RN, Cummins RA (1976) The open-field test: a critical review. *Psychol Bull* 83:482-504.

- [22] Rubin MA, Boemo RL, Jurach A, Rojas DB, Zanolli GR, Obregon AD (2000) Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Behav Pharmacol* 11:57-61.
- [23] Duarte JM, Carvalho RA, Cunha RA, Gruetter R (2009) Caffeine consumption attenuates neurochemical modifications in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Neurochem* 111:368-379.
- [24] Filippi-chiela EC, Thome MP, Bueno e Silva MM, Pelegrini AL, Ledur PF, Garicoche B, Zamin LL, Lenz G (2013) Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells. *BMC Cancer* 13:147-160.
- [25] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 265-275.
- [26] Welinder C, Ekblad L (2011) Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *J Proteome Res* 10:1416-1419.
- [27] Salkovic-Petrisic M, Hoyer S (2007) Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *J Neural Transm* 72:217-233.
- [28] Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Hoyer S, Riederer P (2013) What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *J Neural Transm* 120:233-252.

- [29] Knezovic A, Osmanovic-Barilar J, Curlin M, Hof PR, Simic G, Riederer P, Salkovic-Petrisic M (2015) Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 122:577-592.
- [30] Canto-de-Souza L, Mattioli R (2016) The consolidation of inhibitory avoidance memory in mice depends on the intensity of the aversive stimulus: The involvement of the amygdala, dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex. *Neurobiol Learn Mem* 130:44-51.
- [31] Vianna MR, Szapiro G, McGaugh JL, Medina J H, Izquierdo I. (2001) Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12251-12254.
- [32] DemirÖzkay Ü, Can ÖD, Sağlık BN, Turan N (2017) A benzothiazole/piperazine derivative with acetylcholinesterase inhibitory activity: Improvement in streptozotocin induced cognitive deficits in rats. *Pharmacol Rep* 69:1349-1356.
- [33] Berté TE, Dalmagro AP, Zimath PL, Gonçalves AE, Meyre-Silva C, Bürger C, Weber CJ, Dos Santos DA, Cechinel-Filho V, de Souza MM (2018) Taraxerol as a possible therapeutic agent on memory impairments and Alzheimer's disease: Effects against scopolamine and streptozotocin-induced cognitive dysfunctions. *Steroids* 132:5-11.
- [34] Nakayama D, Yamasaki Y, Matsuki N, Nomura H. (2013). Post-retrieval late process contributes to persistence of reactivated fear memory. *Learn Mem* 20:307-310.

- [35] Cevik B, Solmaz V, Yigitturk G, Cavusoğlu T, Peker G, Erbas O (2017) Neuroprotective effects of erythropoietin on Alzheimer's dementia model in rats. *Adv Clin Exp Med* 26:23-29.
- [36] Khalili-Fomeshi M, Azizi MG, Esmaeili MR, Gol M, Kazemi S, Ashrafpour M, Moghadamnia AA, Hosseinzadeh S (2018) Piperine restores streptozotocin-induced cognitive impairments: Insights into oxidative balance in cerebrospinal fluid and hippocampus. *Behav Brain Res* 30:131-138.
- [37] Adeli S, Zahmatkesh M, Ansari Dezfooli M (2019) Simvastatin Attenuates Hippocampal MMP-9 Expression in the Streptozotocin-Induced Cognitive Impairment. *Iran Biomed J* 23:262-271.
- [38] Clark LF, Kodadek T (2016) The Immune System and Neuroinflammation as Potential Sources of Blood-Based Biomarkers for Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Huntington's disease. *ACS Chem. Neurosci* 18:520-527.
- [39] Spagnuolo C, Napolitano M, Tedesco I, Moccia S, Milito A, Russo GL (2016) Neuroprotective Role of Natural Polyphenols. *Curr Top Med Chem* 16:1943-1950.
- [40] Dinarello CA (2007) Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol* 37:34-45.
- [41] Wang WY, Tan MS, Yu JT, Tan L (2015) Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Ann Transl Med* 3:136-151.

- [42] Alam Q, Alam MZ, Mushtaq G, Damanhour GA, Rasool M, Kamal MA, Haque A (2016) Inflammatory Process in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Central Role of Cytokines. *Curr Pharm Des* 22:541-548.
- [43] Grieb P (2016) Intracerebroventricular streptozotocin injections as a model of Alzheimer's Disease: in search of a relevant mechanism. *Mol Neurobiol* 53:1741-1752.
- [44] Brunet A, Datta SR, Greenberg ME (2001) Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* 11:297-305.
- [45] Liu Y, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX (2011) Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *J Pathol* 225:54-62.
- [46] Tiwari SK, Seth B, Agarwal S, Yadav A, Karmakar M, Gupta SK, Choubey V, Sharma A, Chaturvedi RK (2015) Ethosuximide induces hippocampal neurogenesis and reverses cognitive deficits in amyloid-beta toxin induced Alzheimer's rat model via PI3K/Akt/Wnt/beta-catenin pathway. *J Biol Chem* 290:28540-28558.
- [47] Noor A, Zahid S (2016) A review of the role of synaptosomal-associated protein 25 (SNAP- 25) in neurological disorders. *Int J Neurosci* 127:805-811.

Figure captions

Fig. 1 Effect of tannic acid (30 mg/kg) treatment and ICV-STZ (3 mg/kg) on the inhibitory avoidance task. Data on step-down latency time (6-8 rats per group) are reported as median $\pm$ interquartile range. CTRL = control group; TA = tannic acid group; STZ = streptozotocin group; TA+STZ = tannic acid+streptozotocin group. ## denotes $P<0.01$ compared with CTRL group; ** denotes $P<0.01$ compared with the STZ group. Kruskal-Wallis test.

Fig. 2 Effect of tannic acid (30 mg/kg) treatment and ICV-STZ (3 mg/kg) on the number of cells in the prefrontal cortex. Number of cells was determined using an immunohistochemical reaction for NeuN (A and B) (3-5 rats per group) and cresyl violet staining (C and D) (4-6 rats per group). Data are reported as mean $\pm$ S.E.M. CTRL = control group; TA = tannic acid group; STZ = streptozotocin group; TA+STZ = tannic acid+streptozotocin group. # denotes $P<0.05$ compared with CTRL group; * denotes $P<0.05$ compared with the STZ group. ANOVA (one-way) followed by Tukey test.

Fig. 3 Effect of tannic acid (30 mg/kg) treatment and ICV-STZ (3 mg/kg) on Akt (A), pAkt (B) and SNAP-25 (C) levels in the cerebral cortex of rats (3-4 rats per group). Data are reported as mean $\pm$ S.E.M. CTRL = control group; TA = tannic acid group; STZ = streptozotocin group; TA+STZ = tannic acid+streptozotocin group. ## denotes $P<0.01$ and ### denotes $P<0.001$ compared with CTRL group; ** denotes $P<0.01$ and *** denotes $P<0.001$ compared with the STZ group. ANOVA (one-way) followed by Tukey test.

Fig. 4 Effect of tannic acid (30 mg/kg) treatment and ICV-STZ (3 mg/kg) on TNF- α (A), IL-6 (B), IL-12 (C) and IL-4 (D) levels in the cerebral cortex of rats (5-8 rats per group). Data are reported as mean $\pm$ S.E.M. CTRL = control group; TA = tannic acid group; STZ = streptozotocin group; TA+STZ = tannic acid+streptozotocin group. ## denotes $P < 0.01$ compared with CTRL group; *** denotes $P < 0.001$ compared with the STZ group. ANOVA (one-way) followed by Tukey test.

Fig. 1

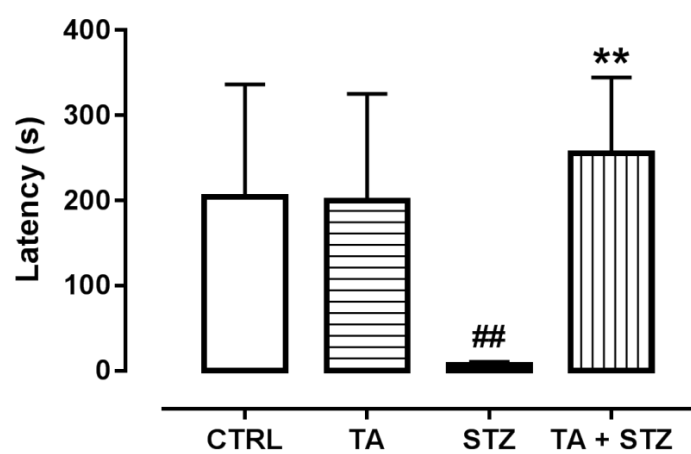


Fig. 2

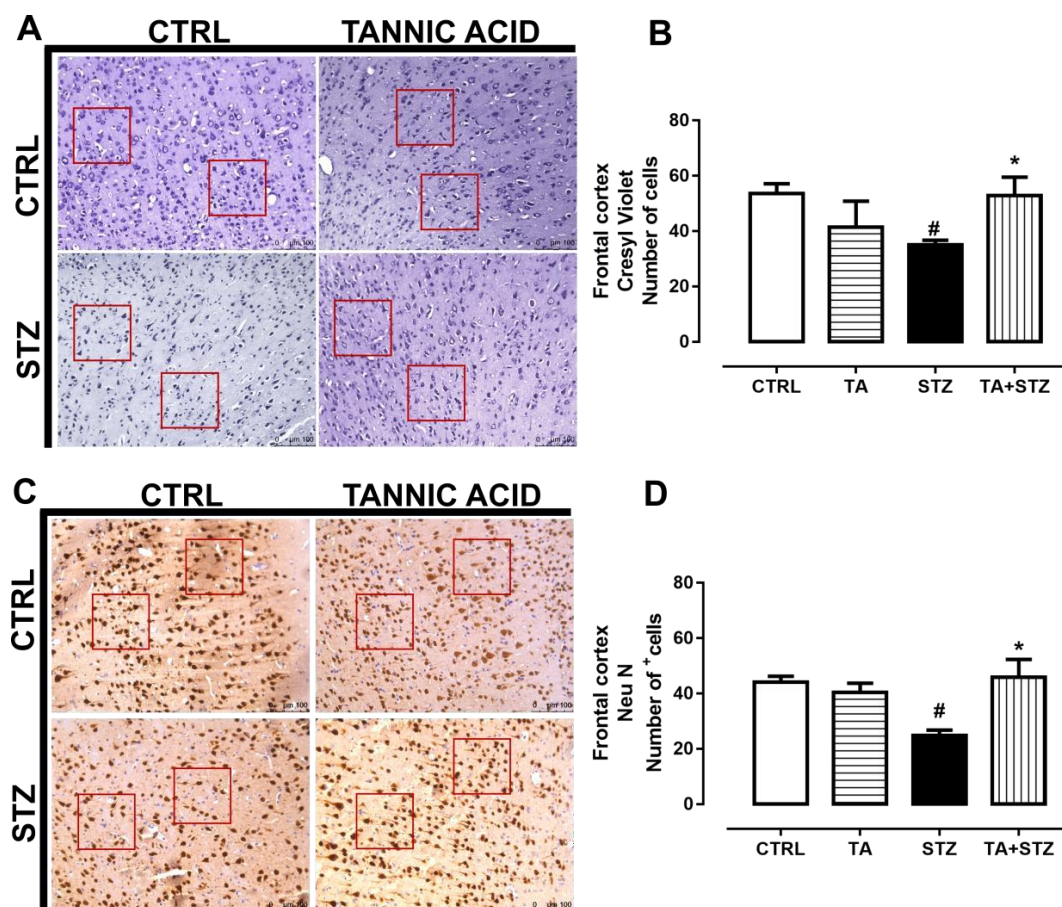


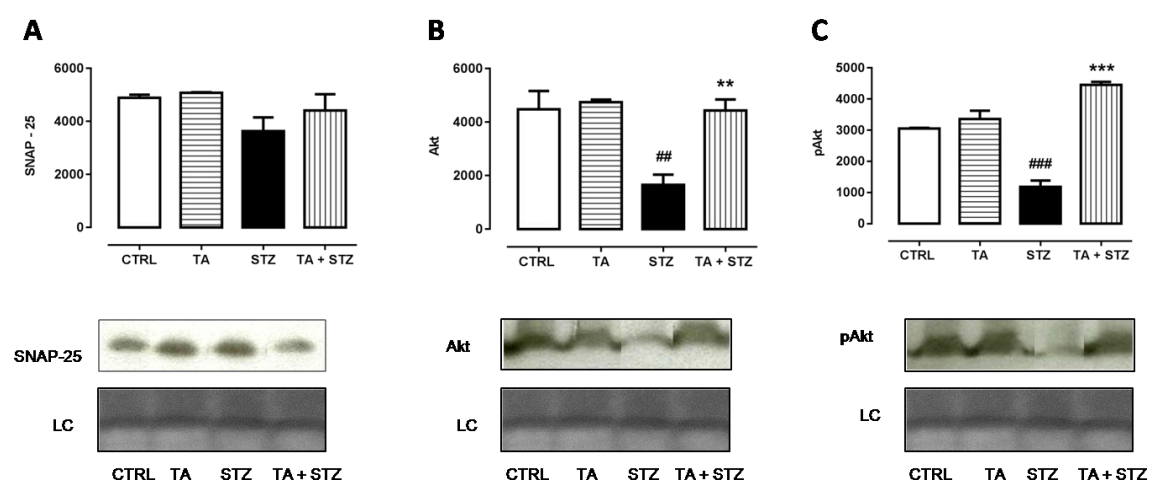
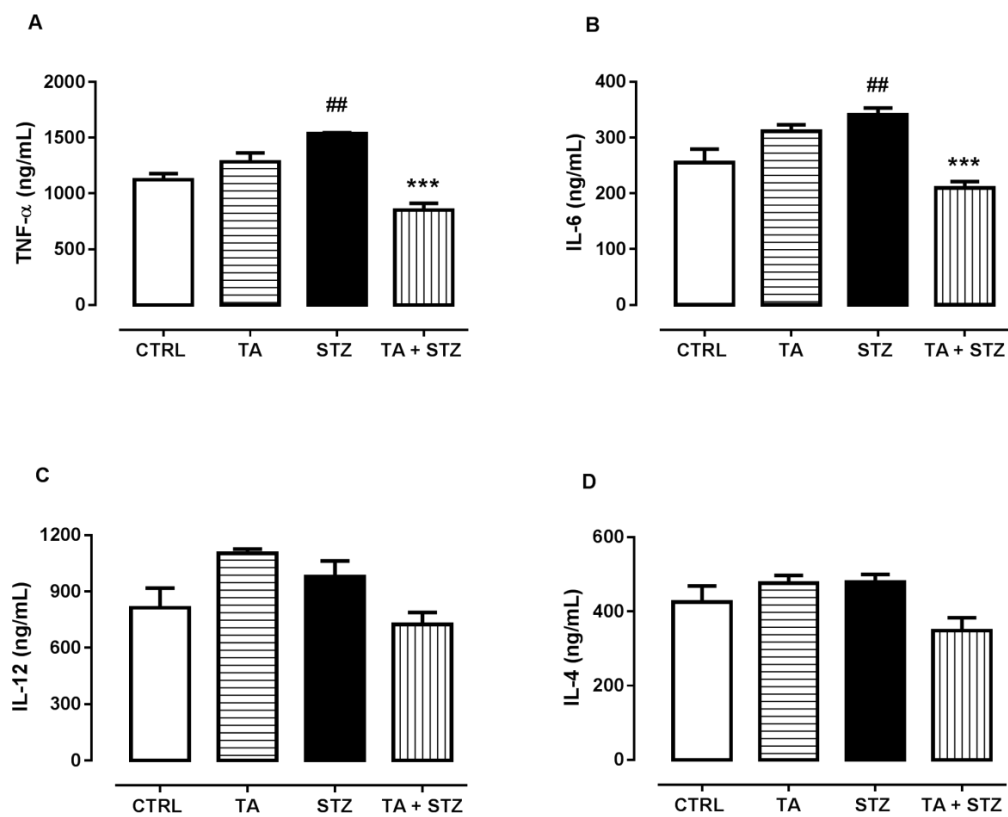
Fig. 3

Fig. 4

6. Considerações finais

No presente trabalho investigamos a capacidade neuroprotetora do AT em prevenir déficit de memória e alterações neuroquímicas induzidas pela administração icv de STZ em um modelo de SDAT. Nossos resultados demonstraram que STZ induziu prejuízos no aprendizado e na memória nos testes avaliados (reconhecimento de objetos, labirinto em Y e esquivas inibitória). No entanto, o tratamento com AT foi capaz de prevenir os prejuízos à memória induzidos por STZ.

Sabe-se que compostos fenólicos, como o AT, podem influenciar positivamente a patologia da DA e reduzir fatores de risco associados à doença, sendo essa ação relacionada a capacidade antioxidante que apresentam (TAN et al., 2012). De fato, vários estudos demonstram o potencial neuroprotetor de compostos polifenólicos (por exemplo, polifenol (-) - epigallocatequina-3-galato do chá verde, resveratrol, curcumina e outros) e atribuem esse efeito às propriedades antioxidante e anti-inflamatória (AHMED et al., 2017; MATTIOLI et al., 2019).

A neuroinflamação e o estresse oxidativo têm sido considerados marcadores da DA, desempenhando um papel crucial na neurotoxicidade (CLARK; KODADEK, 2016; SPAGNUOLO et al., 2016). Neste estudo, observamos que STZ induziu o estresse oxidativo nas estruturas cerebrais testadas (hipocampo e córtex) uma vez que aumentou os níveis de TBARS, ERO e nitrito, bem como reduziu a atividade da enzima antioxidante GPx em ambas as estruturas além de reduzir atividade enzimática de SOD e CAT no córtex cerebral. O AT preveniu o dano aos lipídios tanto em córtex quanto hipocampo, evitou o aumento de nitritos e ERO no hipocampo cerebral, além de prevenir as alterações na atividade de enzimas antioxidantes induzidas por STZ, demonstrando ação antioxidante. Além de induzir estresse oxidativo STZ promoveu neuroinflamação no córtex cerebral demonstrada pelo aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α). O AT demonstrou capacidade anti-inflamatória ao prevenir essas mudanças.

Neste estudo, observamos também que STZ induziu um aumento na atividade da enzima AChE tanto em córtex quanto hipocampo. Além disso STZ induziu uma redução na atividade de ATPase total, NKA total, NKA α 2,3,

NKA α 1 em córtex, enquanto que em hipocampo STZ afetou a atividade de ATPase total, NKA total, NKA α 1. O AT foi efetivo em prevenir esses efeitos nas estruturas cerebrais testadas. Sabe-se que tanto o sistema colinérgico como a atividade de ATPases desempenham um papel central no funcionamento da memória, estando ambos comprometidos na DA (MOSELEY et al., 2007; CHEN et al., 2013). Dessa forma compostos que mantenham atividade desses sistemas, como o AT, podem contribuir positivamente preservando a memória e a cognição.

A fim de melhor compreender os mecanismos envolvidos no efeito protetor à memória demonstrado pelo AT, a modulação da via de sinalização PI3K-Akt no córtex cerebral também foi avaliada. A sinalização via PI3K-Akt desempenha um papel fundamental na sobrevivência neuronal e dados já demonstraram que sua atividade está diminuída na DA (BRUNET; DATTA; GREENBERG, 2001, LIU et al., 2011). O desenvolvimento de resistência à insulina no cérebro e consequente redução da atividade de sinalização PI3K-Akt é considerada um mecanismo chave no desenvolvimento de DA levando à degeneração neurofibrilar (DENG et al., 2009; GRIEB, 2016). Corroborando com essa afirmação, nossos resultados mostraram que STZ diminuiu os níveis de Akt e pAkt no córtex cerebral e o AT impediu essas mudanças mantendo esses níveis. Portanto, podemos sugerir que o AT mantém um funcionamento adequado da via de sinalização PI3K/Akt garantindo a sobrevivência neuronal. De fato, a avaliação histopatológica do córtex cerebral por cresyl violeta e NeuN realizada nesse trabalho demonstrou que STZ reduz significativamente a sobrevivência neuronal, por outro lado, AT é capaz de prevenir esse efeito possivelmente por modular a via PI3K/Akt.

Em conclusão, o AT previne déficit de memória, alterações nas atividades enzimáticas cerebrais, dano oxidativo, alterações na sinalização PI3K-Akt e protege contra a morte neuronal e neuroinflamação na SDAT induzida por STZ em ratos, sendo assim, uma estratégia interessante na prevenção da DA

Referências

AHMED, T.; JAVED, S.; TARIQ, A.; ŠAMEC, D.; TEJADA, S.; NABAVI, S.F.; BRAIDY, N, NABAVI SM. Resveratrol and Alzheimer's Disease: Mechanistic Insights. **Molecular Neurobiology**, v.54, p.2622-2635, 2017.

AKIYAMA, H.; ARAI, T.; KONDO, H.; TANNO, E.; HAGA, C.; IKEDA, K.; Cell mediators of inflammation in the Alzheimer's disease. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, v.14, p.47-53, 2000b.

AKIYAMA, H.; BARGER, S.; BARNUM, S.; BRADT, B., BAUER, J.; COLE, G.M.; COOPER, N.R.; EIKELENBOOM, P.; EMMERLING, M.; FIEBICH, B.L.; FINCH, C.E.; FRAUTSCHY, S.; GRIFFIN, W.S.; HAMPEL, H.; HULL, M.; LANDRETH, G.; LUE, L.; MRAK, R.; MACKENZIE, I.R.; MCGEER, P.L.; O'BANION, M.K.; PACHTER, J.; PASINETTI, G.; PLATA-SALAMAN, C.; ROGERS, J.; RYDEL, R.; SHEN, Y.; STREIT, W.; STROHMEYER, R.; TOOYOMA, I.; VAN MUISWINKEL, F.L.; VEERHUIS, R.; WALKER, D.; WEBSTER, S.; WEGRZYNIAK, B.; WENK, G.; WYSS-CORAY, T. Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v.21, p.383-421, 2000a.

ALAM, Q.; ALAM, M.Z.; MUSHTAQ, G.; DAMANHOURI, G.A.; RASOOL, M.; KAMAL, M.A.; HAQUE, A. Inflammatory Process in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Central Role of Cytokines. **Current Pharmaceutical Design**, v.22, p.541-548, 2016.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimers Dement**, v.13, p.325-373, 2017.

ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. Improving healthcare for people living with dementia: Coverage, quality and costs now and in the future. **World Alzheimer Report**, p.1-140, 2016.

AMOR, S.; PUENTES, F.; BAKER, D.; AND VAN DER VALK, P. Inflammation in neurodegenerative diseases. **Immunology**, v.129, p.154-169, 2010.

ANAND, R.; GILL, K. D.; MAHDI, A. A. Therapeutics of Alzheimer's disease: past, present and future. **Neuropharmacology**, v.76, p.27-50, 2014.

AULD, D.S.; KORNECOOK, T.J.; BASTIANETTO, S.; QUIRION, R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to b-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. **Progress in Neurobiology**, v. 69, p. 209-245, 2002.

BAIERLE, M.; NASCIMENTO, S.N.; MORO, A.M.; BRUCKER, N. FREITAS, F.; GAUER, B.; DURGANTE, J.; BORDIGNON, S.; ZIBETTI, M.; TRENTINI, C.M.; DUARTE, M.M.; GRUNE, T.; BREUSING, N.; GARCIA, S.C. Relationship between Inflammation and Oxidative Stress and Cognitive Decline in the Institutionalized Elderly. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p.1-12, 2015.

BARNHAM, K.J.; BUSH, A.I. Biological metals and metaltargeting compounds in major neurodegenerative diseases. **Chemical Society Reviews**, v.43, p.6727-6749, 2014.

BARTOSZ, G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? **Biochemical Pharmacology**, v.77, p.1303-1315, 2009.

BAUD, V.; KARIN, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. **Trends in Cell Biology**, v.11, p.372-377, 2001.

BETTIO, L.E.B.; RAJENDRAN, L.; GIL-MOHAPEL, J. The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline. **Neuroscience Biobehavioral**, v.79, p.66-86, 2017.

BONIFÁCIO, K.L.; BARBOSA, D.S.; MOREIRA, E.G.; DE FARIAS, C.C.; HIGACHI, L.; CAMARGO, A.E.I.; SOARES, J.F.; VARGAS, H.O.; NUNES, S.O.V.; BERK, M.; DODD, S.; MAES, M. Indices of insulin resistance and glucotoxicity are not associated with bipolar disorder or major depressive disorder, but are differently associated with inflammatory, oxidative and nitrosative Biomarkers. **Journal of Affective Disorders**, v.222, p.185-194, 2017.

BOOM, A.; AUTHELET, M.; DEDECKER, R.; FREDERICK, C.; VAN HEURCK, R.; DAUBIE, V.; LEROY, K.; POCHET, R.; BRION, J.P. Bimodal modulation of tau protein phosphorylation and conformation by extracellular Zn²⁺ in human-tau transfected cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1793, p.1058-1067, 2009.

BOOM, A.; POCHET, R.; AUTHELET, M.; PRADIER, L.; BORGHGRAEF, P.; VAN LEUVEN, F.; HEIZMANN, C.W.; BRION, J.P. Astrocytic calcium/zinc binding protein S100A6 over expression in Alzheimer's disease and in PS1/APP transgenic mice models. **Biochimica et Biophysica Acta** v.1742, p.161-168, 2004.

BRAIDY, N.; JUGDER, B. E.; POLJAK, A.; JAYASENA, T.; NABAVI, S. M.; SACHDEV, P.; GRANT, R. Molecular Targets of Tannic Acid in Alzheimer's Disease. **Current Alzheimer Research**, v.14, p.861-869, 2017.

BROSSERON, F.; KRAUTHAUSEN, M.; KUMMER, M.; HENEKA, M.T. Body fluid cytokine levels in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a comparative overview. **Molecular Neurobiology**, v.50, p.534-544, 2014.

BRUNET, A.; DATTA, S.R.; GREENBERG, M.E. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. **Current Opinion in Neurobiology**, v.11, p.297-305, 2001.

CALDWELL, C.C.; YAO, J.; BRINTON, R.D. Targeting the prodromal stage of Alzheimer's disease: Bioenergetic and mitochondrial opportunities. **Neurotherapeutics**, v.12, p.66-80, 2015.

CAUWENBERGHE, C. V.; BROECKHOVEN, C. V.; SLEEGERS, K. The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives **Genetics in Medicine**, v.18, p.421-430, 2016.

CHEN, C.; LI, X. H.; ZHANG, S.; TU, Y.; WANG, Y. M.; SUN, H. T. 7,8-dihydroxyflavone ameliorates scopolamine induced Alzheimer-like pathologic dysfunction. **Rejuvenation Research**, v.17, p.249-254, 2013.

CHEN, Z.; ZHONG, C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neuroscience Bulletin**, v.30, p. 271-281, 2014.

CLARK, L.F.; KODADEK, T. The Immune System and Neuroinflammation as Potential Sources of Blood-Based Biomarkers for Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Huntington's disease. **ACS Chemical Neuroscience**, v.18, p.520-527, 2016.

DAL PRÀ, I.; CHIARINI, A.; GUI, L.; CHAKRAVARTHY, B.; PACCHIANA, R., GARDENAL, E. Do astrocytes collaborate with neurons in spreading the "infectious" Ab and tau drivers of Alzheimer's disease? **Neuroscientist**, v.21, p. 9-29, 2015.

DENG, Y.; LI, B.; LIU, Y.; IQBAL, K.; GRUNDKE-IQBAL, I.; GONG, C.X. Dysregulation of insulin signaling, glucose transporters, OGlcNAcylation, and phosphorylation of tau and neurofilaments in the brain: implication for Alzheimer's disease. **The American Journal of Pathology**, v.175, p.2089-2098, 2009.

DI MEO, S.; REED, T.T.; VENDITTI, P.; VICTOR, V.M. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2016, p.1-44, 2016.

DINARELLO, C.A. Historical insights into cytokines. **European Journal of Immunology**, v.37, p.34-45, 2007.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, p.47-95, 2002.

DU, H.; GUO, L.; YAN, S.; SOSUNOV, A.A.; MCKHANN, G.M.; YAN, S.S. Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, p.18670-18675, 2010.

FARLOW, M. R.; MILLER, M. L.; PEJOVIC, V. Treatment options in Alzheimer's disease: maximizing benefit, managing expectations. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v.25, p.408-422, 2008.

FILLIT, H.; DING, W.H.; BUEE, L.; KALMAN, J.; ALTSTIEL, L.; LAWLOR, B.; WOLF-KLEIN, G. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letter**, v.129, p.318-320, 1991.

FINCH, C.E.; MORGAN, T.E. Systemic inflammation, infection, ApoE alleles, and Alzheimer disease: a position paper. **Current Alzheimer Research**, v.4, p.185-189, 2007.

FRANKE, T.F. PI3K/Akt: getting it right matters. **Oncogene**, v.27, p.6473-6488, 2008.

GALIMBERTI, D.; SCHOONENBOOM, N.; SCARPINI, E.; SCHELTENS P. Chemokines in serum and cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. **Annals of Neurology**, v.53, p.547-548, 2003.

GANCHEVA, S.; GALUNSKA, B.; ZHELYAZKOVA-SAVOVA, M. Diets rich in saturated fat and fructose induce anxiety and depression-like behaviours in the rat: is there a role for lipid peroxidation? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 98, p.296-306, 2017.

GARELICK, M.G.; KENNEDY, B.K. TOR on the brain. **Experimental Gerontology**, v.46, p.155-163, 2011.

GIBSON, G.E.; KARUPPAGOUNDER, S.S.; SHI, Q. Oxidant-induced changes in mitochondria and calcium dynamics in the pathophysiology of Alzheimer's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1147, p.221-232, 2008.

GREENOUGH, M.A.; CAMAKARIS, J.; BUSH, A.I. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, v. 62, p.540-555, 2013.

GRIEB, P. Intracerebroventricular streptozotocin injections as a model of Alzheimer's Disease: in search of a relevant mechanism. **Molecular Neurobiology**, v.53, p.1741-1752, 2016.

GIDYK, D. C.; DEIBEL, S. H.; HONG N. S.; MCDONALD, R. J. Barriers to developing a valid rodent model of Alzheimer's disease: from behavioral analysis to etiological mechanisms. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, p.245-263 2015.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v.32, p.125-130, 2011.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v.97, p.1634-1658, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. **Measurement of reactive species**, Oxford University Press, Oxford, 4 ed. p.268-340, 2007.

HAMMACHER, A.; WARD, L.D.; WEINSTOCK, J.; TREUTLEIN, H.; YASUKAWA, K.; SIMPSON, R.J. Structure-function analysis of human IL-6: identification of two distinct regions that are important for receptor binding. **Protein Science**, v.3, p.2280-2293, 1994.

HAUGHEY, N.J.; BANDARU, V.V.; BAE, M.; MATTSON, M.P. Roles for dysfunctional sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease neuropathogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1801, p.878-886, 2010.

HAUPTMANN, N.; GRIMSBY, J.; SHIH, J.C.; CADENAS, E. The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.335, p.295-304, 1996.

HERS, I., VINCENT, E.E., TAVARE, J.M. Akt signalling in health and disease. **Cellular Signalling**, v.23, p.1515-1527, 2011.

HOLMSTRÖM, K.M.; FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.15, p.411-421, 2014.

JAGUST, W.J.; LANDAU, S.M. Apolipoprotein E, not fibrillar beta-amyloid, reduces cerebral glucose metabolism in normal aging. **The Journal of Neuroscience**, v.32, p.18227-18233, 2012.

JHA, S.K.; JHA, N.K.; KUMAR, D.; AMBASTA, R.K; KUMAR, P. Linking mitochondrial dysfunction, metabolic syndrome and stress signaling in Neurodegeneration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1869, n.5, p. 1132-1146, 2017.

JONES, D. P. Forum Review: Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.8, p.1865-1879, 2006.

KAMAT, P.K.; KALANI, A.; RAI, S.; SWARNKAR, S.; TOTA, S.; NATH, C.; TYAGI, N. Mechanism of Oxidative Stress and Synapse Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Understanding the Therapeutics Strategies. **Molecular Neurobiology**, v.53, p.648-661, 2016.

KIM, Y.S.; LEE, K.J.; KIM, H. Serum tumour necrosis factor- α and interleukin 6 levels in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Psychogeriatrics**, v.17, p.224-230, 2017.

KIM, T.S.; PAE, C.U.; YOON, S.J.; JANG, W.Y.; LEE, N.J.; KIM, J.J.; LEE, S.J.; LEE, C.; PAIK, I.H.; LEE, C.U. Decreased plasma antioxidants in patients with Alzheimer's disease. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v.21, p.344-348, 2006.

KLOET, D.E.; BURGERING, B.M. The PKB/FOXO switch in aging and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1813, p.1926-1937, 2011.

KRYSTON, T. B.; GEORGIEV, A. B.; PISSIS, P.; GEORGAKILAS, A. G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research**, v.711, p.193-201, 2011.

KUMAR, A.; EKAVALI, A. S. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. **Pharmacological Reports**, v.67, p.195-203, 2015.

KUMAR, B.; ARORA, V.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. *Vaccinium myrtillus* Ameliorates Unpredictable Chronic Mild Stress Induced Depression: Possible Involvement of Nitric Oxide Pathway. **Phytotherapy Research**, v. 26, n.4, p. 488-497, 2012.

KUMAR, A.; DOGRA, S. Neuropathology and therapeutic management of Alzheimer's disease - an update. **Drugs Future**, v.33, p.433-446, 2008.

KURZ, A.; PERNECZKY, R. Novel insights for the treatment of Alzheimer's disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, p. 373-379, 2011.

LANNERT, H.; HOYER, S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. **Behavior Neuroscience**, v.112, p.199-208, 1998.

LEE, J.Y.; COLE, T.B.; PALMITER, R.D.; SUH, S.W.; KOH, J.Y. Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.99, p.7705-7710, 2002.

LI, R.; YANG, L.; LINDHOLM, K.; KONISHI, Y.; YUE, X.; HAMPEL, H.; ZHANG, D.; SHEN, Y. Tumor necrosis factor death receptor signaling cascade is required for amyloid-beta protein-induced neuron death. **Journal of Neuroscience**, v.24, p.1760-1771, 2004.

LIU, G.; HUANG, W.; MOIR, R.D.; VANDERBURG, C.R.; LAI, B.; PENG, Z.; TANZI, R.E.; ROGERS, J.T.; HUANG, X. Metal exposure and Alzheimer's pathogenesis. **Journal of Structural Biology**, v.155, p.45-51, 2006.

LIU, Y.; LIU, F.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K.; GONG, C.X. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. **The Journal of Pathology**, v.225, p.54-62, 2011.

LOVELL, M.A.; ROBERTSON, J.D.; TEESDALE, W.J.; CAMPBELL, J.L.; MARKESBERY, W.R. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. **Journal of the Neurological Sciences**, v.158, p.47-52, 1998.

MANCZAK, M.; ANEKONDA, T.S.; HENSON, E.; PARK, B.S.; QUINN, J.; REDDY, P.H. Mitochondria are a direct site of Abeta accumulation in Alzheimer's disease neurons: Implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. **Human Molecular Genetics**, v.15, p.1437-1449, 2006.

MANTYH, P.W.; GHILARDI, J.R.; ROGERS, S.; DEMASTER, E.; ALLEN, C.J.; STIMSON, E.R.; MAGGIO, J.E. Aluminum, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of beta-amyloid peptide. **Journal of Neurochemistry**, v.61, p.1171-1174, 1993.

MATTIOLI, R.; FRANCIOSO, A.; D'ERME TROVATO, M.; MANCINI, P.; PIACENTINI, L.; CASALE, A.M.; WESSJOHANN, L.; GAZZINO, R.; COSTANTINO, P.; MOSCA, L. Anti-Inflammatory Activity of A Polyphenolic Extract from *Arabidopsis thaliana* in In Vitro and In Vivo Models of Alzheimer's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, p.708-727, 2019.

MATTSON, M.P.; CUTLER, R.G.; JO, D.G. Alzheimer peptides perturb lipid-regulating enzymes. **Nature Cell Biology**, v.7, p.1045- 1047, 2005.

MEZZAROBÀ, L.; ALFIERI, D.F.; COLADO, SIMÃO, A.N.; VISSOCI REICHE, E.M. The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases. **Neurotoxicology**, v.74, p.230-241, 2019.

MILLER, L.M.; WANG, Q.; TELIVALA, T.P.; SMITH, R.J.; LANZIROTTI, A.; MIKLOSSY, J. Synchrotron-based infrared and Xray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with beta-amyloid deposits in Alzheimer's disease. **J Struct Biol** **155**, 30-37, 2006.

MOORE, A.H.; O'BANION, K. Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. **Adv. Drug Del. Rev.**, 54: 1627-1656, 2002.

MORI, T.; REZAI-ZADEH, K.; KOYAMA, N.; ARENDASH, G.; YAMAGUCHI, H.; KAKUDA, N.; HORIKOSHI-SAKURABA, Y.; TAN, J.; TOWN, T. Tannic Acid is a natural β -secretase inhibitor that prevents cognitive impairment and mitigates Alzheimer-like pathology in transgenic mice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 6912-6927, 2012.

MOSCONI, L.; PUPI, A.; DE LEON, M.J. Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1147, p.180-195, 2008.

MOSCONI, L.; DE SANTI, S.; LI, J.; TSUI, W. H.; LI, Y.; BOPPANA, M.; LASKA, E.; RUSINEK, H. Hippocampal hypometabolism predicts cognitive decline from normal aging. **Neurobiology Aging**, v.29, p.676-692, 2008.

MOSELEY, A.E.; LIESKE, S. P.; WETZEL, R. K.; JAMES, P. F.; HE, S., SHELLY, D.A., The Na,K-ATPase alpha 2 isoform is expressed in neurons, and its absence disrupts neuronal activity in new born mice. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.5317-5324, 2003.

MUCKE, L. Alzheimer's disease. **Nature neuroscience**, v.461, p.895-897, 2009.

NAKABEPPU, Y. Molecular Pathophysiology of Insulin Depletion, Mitochondrial Dysfunction, and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease Brain. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.1128, p.27-44, 2019.

NAKAJIMA, K.; KOHSAKA, S. Microglia: Activation and their significance in the central nervous system. **Journal of Biochemistry**, v.130, p.169-175, 2001.

O' NEILL, C. PI3-kinase/Akt/mTOR signaling: Impaired on/off switches in aging, cognitive decline and Alzheimer's disease. **Experimental Gerontology**, v. 48, p. 647-653, 2013.

ONO, K.; HASEGAWA, K.; NAIKI, H.; YAMADA, M. Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1690, p.193-202, 2004.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**, v.87, p.315-424, 2007.

PALLADINO, M.A.; BAHJAT, F.R.; THEODORAKIS, E.A.; MOLDAWER, L.L. Anti-TNF α therapies: the next generation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.2, p.736-746, 2003.

PEÑA-BAUTISTA, C.; LÓPEZ-CUEVAS, R.; CUEVAS, A.; BAQUERO, M.; CHÁFER-PERICÁS, C. Lipid peroxidation biomarkers correlation with medial temporal atrophy in early Alzheimer Disease. **Neurochemistry International**, v.6, p.129-135, 2019.

PICKLO, M.J.; MONTINE, T.J.; AMARNATH, V.; NEELY, M.D. Carbonyl toxicology and Alzheimer's disease. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.184, p.187-197, 2002.

PUZZO, D.; LEE, L.; PALMERI, A.; CALABRESE, G.; ARANCIO, O. Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: practical considerations and guidelines. **Biochemical Pharmacology**, v.88, p.450-467, 2014.

RAIVICH, G.; BOHATSCHEK, M.; KLOSS, C.U.; WERNER, A.; JONES, L.L.; KREUTZBERG, G.W. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. **Brain Research Reviews**, v.30, p.77-105, 1999.

RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; RENGARAJAN, T.; PALANISWAMI, R.; GNANADHAS, E.N.; LAKSHMINARASIAH, U.; GOPAS, J.; NISHIGAKI, I.

Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, v.436, p.332-347, 2014.

RAMASSAMY, C.; KRZYWKOWSKI, P.; AVERILL, D.; LUSSIER-CACAN, S.; THEROUX, L.; CHRISTEN, Y.; DAVIGNON, J.; POIRIER, J. Impact of apoE deficiency on oxidative insults and antioxidant levels in the brain. **Molecular Brain Research**, v.86, p.76-83, 2001.

RAY, P.D.; HUANG, B.W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v.24, p.981-990, 2012.

REDDY, P.H. Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease. **Brain Research**, v.1415, p.136-148, 2011.

REDDY, P.H.; TRIPATHI, R.; TROUNG, Q.; TIRUMALA, K.; REDDY, T.P.; ANEKONDA, V.; SHIRENDEB, U.P.; CALKINS, M.J.; REDDY, A.P.; MAO, P.; MANCZAK, M. Abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration as early events in Alzheimer's disease: Implications to mitochondria-targeted antioxidant therapeutics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1822, p.639-649, 2012.

REIMAN, E.M.; CHEN, K.; ALEXANDER, G.E.; CASELLI, R.J.; BANDY, D.; OSBORNE, D.; SAUNDERS, A.M.; HARDY, J. Functional brain abnormalities in young adults at genetic risk for late onset Alzheimer's dementia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, p.284-289, 2004.

ROSENBERG, P.B. Clinical aspects of inflammation in Alzheimer's disease. **International Review of Psychiatry**, v.17, p.503-514, 2005.

RYBKA, J.; KEDZIORA-KORNATOWSKA, K.; BANAS-LEZANSKA, P.; MAJSTEREK, I.; CARVALHO, L.A.; CATTANEO, A.; ANACKER, C.; KEDZIORA, J. Interplay between the pro-oxidant and antioxidant systems and proinflammatory cytokine levels, in relation to iron metabolism and the erythron in depression. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 63, p.187-194, 2013.

SALKOVIC-PETRISIC, M.; OSMANOVIC-BARILAR, J.; KNEZOVIC, A. Long-term oral galactose treatment prevents cognitive deficits in male Wistar rats treated intracerebroventricularly with streptozotocin. **Neuropharmacology**, v.77, p.68-80, 2014.

SAYRE LM, PERRY G, HARRIS PL, LIU Y, SCHUBERT KA, SMITH MA In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's

disease: A central role for bound transition metals. **Journal of Neurochemistry**, v.74, p.270-279, 2000.

SCHIFILLITI, D.; SANTAMARIA, L. B.; ROSA, G.; NINO, G. D.; MANDAL, P. K.; FODALE, V. Cholinergic central system, Alzheimer's disease, and anaesthetics liaison: a vicious circle? **Journal of Alzheimers Disease**, v.22, p.35-41, 2010.

SCHIPPLING, S.; KONTUSH, A.; ARLT, S.; BUHMANN, C.; STURENBURG, H.J.; MANN, U.; MULLER-THOMSEN, T.; BEISIEGEL, U. Increased lipoprotein oxidation in Alzheimer's disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v.28, p.351-360, 2000.

SCHMITT, K.; GRIMM, A.; KAZMIERCZAK, A.; STROSZNAJDER, J.B.; GOTZ, J.; ECKERT, A. Insights into mitochondrial dysfunction: Aging, amyloid-beta, and tau-A deleterious trio. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.16, p.1456-1466, 2012.

SERRANO, J.; PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; DAUER, A.; AURA, A. M.; SAURACALIXTO, F. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 53, p. 310-329, 2009.

SIES, H.; ARTEEL, G. E. Interaction of peroxynitrite with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics. **Free Radical Biology and Medicine**, v.28, p.1451-1455, 2000.

SPAGNUOLO, C.; NAPOLITANO, M.; TEDESCO, I.; MOCCIA, S.; MILITO, A.; RUSSO, G.L. Neuroprotective Role of Natural Polyphenols. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.16, p.1943-1950, 2016.

STOLTENBERG, M.; BUSH, A.I.; BACH, G.; SMIDT, K.; LARSEN, A.; RUNGBY, J.; LUND, S.; DOERING, P.; DANSCHER, G. Amyloid plaques arise from zinc-enriched cortical layers in APP/PS1 transgenic mice and are paradoxically enlarged with dietary zinc deficiency. **Neuroscience**, v.150, p.357-369, 2007.

SULTANA, R.; MECOCCI, P.; MANGIALASCHE, F.; CECCHETTI, R.; BAGLIONI, M.; BUTTERFIELD, D.A. Increased protein and lipid oxidative damage in mitochondria isolated from lymphocytes from patients with Alzheimer's disease: Insights into the role of oxidative stress in Alzheimer's disease and initial investigations into a potential biomarker for this dementing disorder. **Journal of Alzheimers Disease**, v.24, p.77-84, 2011.

TAN, H. P.; HUA WONG, D. Z.; KIONG LING, S.; CHUAH, C. H.; ABDUL KADIR, H. Neuroprotective activity of galloylated cyanogenic glucosides and hydrolysable tannins isolated from leaves of *Phyllagathis rotundifolia*. **Fitoterapia**, v.83, p.223-229, 2012.

TARKOWSKI, E. Cytokines in dementias. **Current Drug Targets - Inflammation & Allergy**, v.1, p.193-200, 2002.

TÖNNIES, E.; TRUSHINA, E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.57, p.1105-1121, 2017.

TOUGU, V.; KARAFIN, A.; PALUMAA, P. Binding of zinc(II) and copper(II) to the full-length Alzheimer's amyloid-beta peptide. **Journal of Neurochemistry**, v.104, p.1249-1259, 2008.

TRUSHINA, E.; DUTTA, T.; PERSSON, X.M.; MIELKE, M.M.; PETERSEN, R.C. Identification of altered metabolic pathways in plasma and CSF in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease using metabolomics. **PLoS One**, v.8, p.1-13, 2013.

TRUSHINA, E.; MCMURRAY, C.T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. **Neuroscience**, v.145, p.1233-1248, 2007.

TRUSHINA, E.; NEMUTLU, E.; ZHANG, S.; CHRISTENSEN, T.; CAMP, J.; MESA, J.; SIDDIQUI, A.; TAMURA, Y.; SESAKI, H.; WENGENACK, T.M.; DZEJA, P.P.; PODUSLO, J.F. Defects in mitochondrial dynamics and metabolomic signatures of evolving energetic stress in mouse models of familial Alzheimer's disease. **PLoS One**, v.7, p.1-17, 2012.

TUPPO, E.E.; ARIAS, H.R. The role of inflammation in Alzheimer's disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.37, p.289-305, 2005.

UTTARA, B.; SINGH, A.V.; ZAMBONI, P.; MAHAJAN, R.T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current Neuropharmacology**, v.7, p.65-74, 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.44-84, 2007.

VALLA, J.; YAARI, R.; WOLF, A.B.; KUSNE, Y.; BEACH, T.G.; ROHER, A.E.; CORNEVEAUX, J.J.; HUENTELMAN, M.J.; CASELLI, R.J.; REIMAN, E.M. Reduced posterior cingulate mitochondrial activity in expired young adult carriers of the APOE epsilon4 allele, the major late-onset Alzheimer's susceptibility gene. **Journal of Alzheimers Disease**, v.22, p.307-313, 2010.

WANG, P.; WANG, Z.Y. Metal ions influx is a double edged sword for the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Ageing Research Reviews**, v.35, p.265-290, 2016.

WANG, W.Y.; TAN, M.S.; YU, J.T.; TAN, L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. **Annals of Translational Medicine**, v.3, p.136-151, 2015.

WYSS-CORAY, T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? **Nature Medicine**, v.12, p.1005-1015, 2006.

YAO, J.; GAO, X.; SUN, W.; YAO, T.; SHI, S.; JI, L. Molecular Hairpin: A Possible Model for Inhibition of Tau Aggregation by Tannic Acid. **Biochemistry**, v.52, p.1893-1902, 2013.

ZHANG, X.Y.; YAO, J.K. Oxidative stress and therapeutic implications in psychiatric disorders. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological**, v.46, p.197-199, 2013.

Anexo

Carta de parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal



Pelotas, 14 de setembro de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Profa. Dra. Francieli Moro Stefanello

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Senhora Professora:

A CEEA analisou o projeto intitulado: “**Estudos *in vitro* e *in vivo* de produtos naturais como possíveis agentes neuroprotetores em modelos experimentais para a doença de Alzheimer**”, processo nº23110.004611/2015-70 que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 4611-2015).

Vigência do Projeto: 15/09/2015 a 01/09/2018

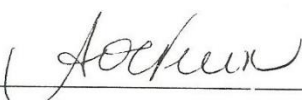
Espécie/Linhagem: *Rattus norvegicus*/Wistar

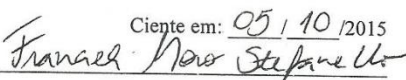
Nº de animais: 292

Idade: 192 com 60 dias e 100 RN

Sexo: Machos e Fêmeas

Origem: Biotério Central/Ufpel


 M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Assinatura do Professor Responsável:  Ciente em: 05/10/2015