

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



Tese

**Efeito neuroprotetor do extrato de amora preta (*Rubus* sp.) em
mecanismos associados ao desenvolvimento e a progressão da Doença
de Alzheimer: um estudo em modelos pré-clínicos**

Julia Eisenhardt de Mello

Pelotas, 2023

Julia Eisenhardt de Mello

**Efeito neuroprotetor do extrato de amora preta (*Rubus* sp.) em
mecanismos associados ao desenvolvimento e a progressão da Doença
de Alzheimer: um estudo em modelos pré-clínicos**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Roselia Maria Spanevello

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M527e Mello, Julia Eisenhardt de

Efeito neuroprotetor do extrato de amora preta (*Rubus sp.*) em mecanismos associados ao desenvolvimento e a progressão da doença de Alzheimer : um estudo em modelos pré-clínicos / Julia Eisenhardt de Mello ; Roselia Maria Spanevello, orientadora. — Pelotas, 2023.

111 f. : il.

Tese (Doutorado) — Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. *Rubus sp.*. 2. Doença de alzheimer. 3. Memória. I. Spanevello, Roselia Maria, orient. II. Título.

CDD : 634.38

Elaborada por Maria Beatriz Vaggetti Vieira CRB: 10/1032

Julia Eisenhardt de Mello

**Efeito neuroprotetor do extrato de amora preta (*Rubus* sp.) em
mecanismos associados ao desenvolvimento e a progressão da Doença
de Alzheimer: um estudo em modelos pré-clínicos**

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

Data de defesa: 31/03/2023

Banca examinadora:



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



Prof. Dr. Adriano Martimbianco de Assis – Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



Prof.^a Dr.^a Bruna Ferrary Deniz – Doutora em Ciências Biológicas (Neurociências) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



Prof.^a Dr.^a Jucimara Baldissarelli - Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria.

Dedico este trabalho à minha família, à minha orientadora e especialmente à todas as pessoas que sofrem de alguma doença que ainda não tem cura.

Agradecimentos

Inicialmente agradeço à Deus, por guiar e iluminar o meu caminho. Por me fazer ter fé para acreditar que Ele está cuidando de tudo e por me dar força e paciência para entender que tudo tem um propósito.

Aos meus pais, Isabel e Volnei, agradeço imensamente por tudo. Vocês são o meu maior exemplo de caráter, honestidade, dedicação e amor ao que fazem. Obrigada por acreditarem na minha trajetória, apoiar, incentivar e fornecerem todo o suporte necessário. Obrigada por muitas vezes abdicarem dos sonhos de vocês, para apoiar os meus. Esta é uma das infinitas formas de amor que recebo a vida toda de vocês. Amo vocês infinito!

Às minhas irmãs, Aléxia e Fernanda, agradeço por terem me ensinado tantas coisas ao longo da vida. Obrigada por me ensinarem principalmente, a dividir e a multiplicar desde criança e me fazerem entender que cada um tem a sua trajetória, no seu tempo. Obrigada por serem as minhas melhores amigas, por estarem sempre se desdobrando para podermos estarmos juntas e unidas como sempre fomos. Aléxia, obrigada pelos maiores presentes que podias me dar, a Antônia e a Lívia, e por dividir a alegria e o amor mais puro que existe no mundo. Fernanda, meu braço direito, minha filha e minha mãe. Não existem palavras que transpõem a minha gratidão por tantos momentos vividos juntas. Obrigada por absolutamente tudo! Amo vocês para todo o sempre!

Ao meu namorado Luiz Henrique, agradeço por todo o amor, carinho e apoio. Obrigada por ter estado comigo e me dado tanta força nos períodos mais difíceis deste período. Abraçou o meu experimento como se fosse o teu. Foi ombro amigo, força e proteção. Obrigada por compreender a minha ausência em muitos momentos e mesmo à distância, se fazer sempre presente. Te amo!

Aos demais familiares e grandes amigos que tenho na minha cidade natal, agradeço o apoio, incentivo e o carinho que sempre tiveram comigo. Obrigada por entenderem os momentos de ausência.

Agradeço à Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade de poder ingressar na instituição e concluir minha pós-graduação nesta universidade pública e de qualidade.

À minha orientadora, Roselia Spanevello, por ter aceitado me orientar, por me acolher, me ensinar e me ajudar a crescer. Rose, obrigada por toda a tua

dedicação, teu empenho, incentivo e paciência. Tu és um exemplo de pessoa e profissional. Obrigada por todas as tuas palavras, energia positiva e por teu abraço apertado que nos traz a certeza que tudo dará certo no final. Sou eternamente grata por tudo.

À professora Francieli Stefanello, agradeço por toda a ajuda, confiança, trocas e ensinamentos durante este período. Pela voz doce que acalma, abraço que reinicia e risada que contagia. És muito especial.

Aos grandes colegas e amigos que o NeuroBio me presenteou, agradeço pela convivência diária, colaboração e auxílio. Aos desafios que nos eram propostos, conseguimos criar laços muito fortes e nos moldarmos às adversidades. Em especial à Alessandra e a Mayara, por me ajudarem em diversos momentos de dificuldade. Obrigada por todo o apoio de cada um de vocês. Moram no meu coração.

Às colegas que viraram amigas, Fernanda e Juliane, obrigada por me introduzirem no mundo da bioquímica, por terem pegado a minha mão e confiado em mim. Me permitiram ser quem eu sou e se mantiveram sempre presentes. Obrigada por tudo!

Agradeço especialmente à Karina, que conquistou um espaço muito especial na minha vida durante os últimos anos. Minha colega e amiga querida, apoiadora e ombro amigo. Obrigada por dividir tantas tarefas e aprendizados comigo. Foi muito bom ter ganhado a tua amizade e fazer esta caminhada ser mais leve.

Às amigas que se mantiveram comigo nos dias bons e ruins, Érika, Gabriela, Kamila, Luiza, Luize e Paula. Vocês são responsáveis por recarregar as baterias e manter a energia sempre positiva. Grandes amigas que levarei para sempre comigo. Amo vocês!

Obrigada à veterinária Anelize Campello por todo o conhecimento compartilhado, pela ajuda e pelas oportunidades que me destes. É um exemplo de ser humano e profissional. Agradeço também à grande equipe do Biotério Central da UFPel, pelo auxílio e por toda a dedicação e preocupação com os protocolos desenvolvidos.

Aos professores e pesquisadores que foram tão importantes durante esta caminhada, que contribuíram com a minha formação e possibilitaram a

conclusão do meu trabalho. Em especial às professoras Jucimara, Rejane e Wilson.

Aos grandes amigos que fiz pelos corredores, obrigada pelos cafezinhos e companheirismo durante a pandemia. Em especial ao Douglas e Eduardo.

Agradeço à banca pela disponibilidade e pelo aceite em contribuir e avaliar o meu trabalho.

Por fim, agradeço ao PPGBBio pela oportunidade de poder cursar a pós-graduação. Aos funcionários da UFPel pelo trabalho exercido e a CAPES pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação, o meu mais sincero, Muito obrigada!

“Somos o que lembramos e também aquilo que não queremos lembrar. ”

(Iván Izquierdo)

Resumo

DE MELLO, Julia Eisenhardt. **Efeito neuroprotetor do extrato de amora preta (*Rubus* sp.) em mecanismos associados ao desenvolvimento e a progressão da Doença de Alzheimer: um estudo em modelos pré-clínicos** 2023. 111 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa, progressiva e irreversível que acarreta em perda de memória e declínio cognitivo. Dentre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na DA, pode-se citar o déficit colinérgico, a neuroinflamação, o estresse oxidativo, a hiperfosforilação da proteína Tau (p-Tau) e alterações no metabolismo cerebral da glicose. Considerando que os fármacos disponíveis para o tratamento da DA apenas amenizam os sintomas, é necessário a busca por novas alternativas farmacológicas que possam auxiliar na prevenção e na progressão desta doença. A amora preta (*Rubus* sp.) é um fruto rico em compostos bioativos, como por exemplo, as antocianinas. Dados da literatura tem demonstrado que o extrato deste fruto apresenta atividade neuroprotetora em diferentes modelos experimentais. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial terapêutico do extrato de *Rubus* sp. em modelos pré-clínicos da DA. Ratos Wistar adultos machos foram submetidos a um modelo experimental de amnésia ou de demência esporádica do tipo Alzheimer, induzidos por escopolamina (SCO 1 mg/kg) e estreptozotocina (STZ 3 mg/kg), respectivamente. No modelo de SCO, os animais receberam o extrato de *Rubus* sp. por via intragástrica nas concentrações de 100 e 200 mg/kg durante 10 dias. No protocolo do STZ, os animais receberam injeção intracerebroventricular de STZ e os animais foram tratados com extrato de amora preta (100 e 200 mg/kg) por 21 dias. No final de cada protocolo experimental foram realizados testes comportamentais para avaliar a memória e após, os animais foram submetidos a eutanásia e o córtex cerebral, hipocampo e cerebelo foram coletados para as análises bioquímicas. No protocolo com SCO, o donepezil foi utilizado como controle positivo e no protocolo da STZ, a metformina foi usada como controle positivo. Em ambos os protocolos, o extrato de *Rubus* sp. foi capaz de prevenir ou reverter os déficits de memória, estresse oxidativo e o aumento da atividade da acetilcolinesterase (AChE). No protocolo da SCO, observou-se que o extrato de *Rubus* sp. possui efeito semelhante ao donepezil. No protocolo do STZ, o extrato de *Rubus* sp. também preveniu o aumento de interleucina 6 (IL-6) em hipocampo, e as alterações na expressão gênica de GSK3 β e Nrf2 induzidas pelo STZ. A metformina, utilizada no protocolo da STZ teve efeitos semelhantes ao extrato de *Rubus* sp. Os resultados obtidos destacam que o extrato de *Rubus* sp. atua em diversos alvos cerebrais, demonstrando assim seu potencial neuroprotetor e ressaltando a importância da investigação dos produtos naturais em doenças que acometem o sistema nervoso central (SNC).

Palavras-chave: Amora-preta, memória; estresse oxidativo; acetilcolinesterase; neuroinflamação; proteína tau.

Abstract

DE MELLO, Julia Eisenhardt. **Neuroprotective effect of blackberry extract (*Rubus* sp.) on mechanisms associated with the development and progression of Alzheimer's disease: a study in preclinical models.** 2023. 111 f. Thesis (Doctorate) – Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting Federal University of Pelotas, Pelotas, 2023.

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative, progressive and irreversible disease that leads to memory loss and cognitive decline. Among the pathophysiological mechanisms involved in AD, we can mention cholinergic deficit, neuroinflammation, oxidative stress, hyperphosphorylation of the Tau protein (p-Tau) and alterations in cerebral glucose metabolism. Considering that the drugs available for the treatment of AD only alleviate the symptoms, it is necessary to search for new pharmacological alternatives that can help in the prevention and progression of this disease. Blackberry (*Rubus* sp.) is a fruit rich in bioactive compounds, such as anthocyanins. Data from the literature have shown that the extract of this fruit has neuroprotective activity in different experimental models. Thus, the aim of this study was to evaluate the therapeutic potential of *Rubus* sp. in preclinical models of AD. Adult male Wistar rats were submitted to an experimental model of amnesia or sporadic dementia of the Alzheimer type, induced by scopolamine (SCO 1 mg/kg) and streptozotocin (STZ 3 mg/kg), respectively. In the SCO model, the animals received the *Rubus* sp. intragastrically at concentrations of 100 and 200 mg/kg for 10 days. In the STZ protocol, the animals received an intracerebroventricular injection of STZ and the animals were treated with blackberry extract (100 and 200 mg/kg) for 21 days. At the end of each experimental protocol, behavioral tests were performed to assess memory and after, the animals were euthanized and the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum were collected for biochemical analysis. In the SCO protocol, donepezil was used as a positive control and in the STZ protocol, metformin was used as a positive control. In both protocols, the *Rubus* sp. was able to prevent or reverse memory deficits, oxidative stress and increased acetylcholinesterase (AChE) activity. In the SCO protocol, it was observed that the *Rubus* sp. has similar effect to donepezil. In the STZ protocol, the *Rubus* sp. it also prevented the increase of interleukin 6 (IL-6) in the hippocampus, and the changes in the gene expression of GSK3 β and Nrf2 induced by STZ. Metformin, used in the STZ protocol, had similar effects to the *Rubus* sp. The obtained results highlight that the extract of *Rubus* sp. acts on several brain targets, thus demonstrating its neuroprotective potential and highlighting the importance of investigating natural products in diseases that affect the central nervous system (CNS).

Keywords: Blackberry, memory; oxidative stress; acetylcholinesterase; neuroinflammation, tau protein.

Lista de Figuras

Figura 1: Processo de clivagem do APP.	222
Figura 2: Processo de enovelamento da proteína Tau.	233
Figura 3: Representação do sistema colinérgico.	255
Figura 4: Esquema representativo do estresse oxidativo no cérebro.	266
Figura 5: Representação da cascata de sinalização de insulina intracelular.	300

Lista de Abreviaturas

ACh – Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
APP – Proteína Percursora da Amiloide
CAT – Catalase
DA – Doença de Alzheimer
DM – Diabetes Mellitus
ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
FAD – Familiar Alzheimer Disease
FDA – Food and Drug Administration
GPX – Glutathione Peroxidase
GSH – Glutathione Reduzida
GSK3 β - Glicogênio Sintase Quinase 3 β
GST – Glutathione S-transferase
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
IGF - Fator de Crescimento Semelhante a Insulina
IL-10 – Interleucina 10
IL-6 – Interleucina 6
IRS1 - Substrato 1 do Receptor de Insulina
LOAD – Late Onset Alzheimer Disease
LPS - Lipopolissacarídeo
NMDA – N-metil D-aspartato
Nox - NADPH oxidase
NTF – Emaranhados Neurofibrilares
O₂^{-•} - Ânion superóxido
OH[•] - Radical hidroxila
ONOO⁻ - Peroxinitrito
PI3K – Fosfatidilinositol-3-cinase
p-Tau – Proteína Tau
RI – Receptores de Insulina
SCO – Escopolamina
SH – Sulfidrilas

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido dismutase

STZ – Estreptozotocina

TBARS – Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

β A – Beta-amilóide

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1 Doença de Alzheimer	19
3.2 Mecanismos envolvidos na Doença de Alzheimer	21
3.3 Produtos Naturais	31
3.4 Modelos animais utilizados na avaliação da DA	34
4. RESULTADOS	37
4.1 Capítulo 1	37
4.2 Capítulo 2	50
4.3 Capítulo 3	86
5. DISCUSSÃO	92
6. CONCLUSÕES	96
7. PERSPECTIVAS	97
8. REFERÊNCIAS	98
ANEXOS	110
I. Carta de Aceite do CEUA do protocolo de SCO	110
II. Carta de Aceite do CEUA do protocolo de STZ	111

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, estima-se que 55 milhões de pessoas no mundo sejam acometidas por algum tipo de demência, sendo a Doença de Alzheimer (DA), a causa mais comum de demência em idosos (DMS-5, 2014; ALZHEIMER ASSOCIATION, 2022). A DA é um transtorno neurodegenerativo, progressivo e irreversível, caracterizado principalmente pela perda da memória, o qual é observado na fase inicial da doença, evoluindo até uma demência do tipo Alzheimer, sendo esta, a forma mais agressiva e incapacitante (PASSERI *et al.*, 2022).

É bem descrito que a DA apresenta como principais características fisiopatológicas a deposição do peptídeo β -amilóide (β A), formação de emaranhados neurofibrilares (NTF), déficit colinérgico, estresse oxidativo e neuroinflamação (CHEN, 2018). Além disso, pesquisadores tem descrito que a deficiência do metabolismo de glicose cerebral é um fator que também contribui para o desenvolvimento e a progressão da DA (BLAZQUEZ *et al.*, 2014). Isto tem sido levado em consideração, uma vez que fatores observados no diabetes mellitus (DM) como deficiência no metabolismo da glicose, aumento de estresse oxidativo e processos inflamatórios, também são observados na DA (FERNANDEZ e TORRES-ALEMAN, 2012). Considerando que pacientes com DM que fazem uso de fármacos antidiabéticos como a metformina, apresentam uma melhora na memória e na cognição, estudos clínicos e pré-clínicos também avaliaram essa classe farmacológica na DA. Os dados obtidos sugerem que estes fármacos também podem ser promissores no manejo desta desordem neurodegenerativa (KESHAVARZI *et al.*, 2019; PILIPENKO *et al.*, 2020).

Tendo em vista o aumento da longevidade populacional, observa-se que há uma maior incidência de doenças crônicas e incapacitantes, como a DA. Entretanto, os fármacos disponíveis atualmente para o tratamento desta doença são capazes somente de retardar o déficit cognitivo e funcional dos pacientes, não levando a cura. Este fato acarreta em problemas de saúde pública, uma vez que demanda um maior número de internações hospitalares e tratamentos adjuvantes para a manutenção da qualidade da saúde do paciente, visando uma maior expectativa de vida. Sendo assim, apesar da intensa pesquisa gerada nos últimos anos, ainda há uma compreensão limitada e inconclusiva da etiologia e

fisiopatologia da DA, havendo assim, a necessidade da busca por novas alternativas farmacológicas ou adjuvantes para o tratamento desta doença.

Neste contexto, extratos de produtos naturais ricos em antocianinas têm demonstrado atividade neuroprotetora em diversas doenças que afetam o SNC (FOLMER, BASAVARAJU, JASPARS, 2014). Dentre as espécies ricas em antocianinas, pode-se citar a *Rubus* sp., uma fruta que apresenta coloração roxa e é conhecida popularmente como amora preta. A atividade antioxidante deste fruto pode ser atribuída aos compostos fenólicos presentes em sua estrutura (SELLAPPAN *et al.*, 2002; SIRWOHARN *et al.*, 2004). A amora preta apresenta majoritariamente a antocianina cianidina-O-galactosídeo em sua composição, a qual já foi relatada por possui ação neuroprotetora em modelos pré-clínicos da Doença de Parkinson, Esclerose Múltipla, isquemia cerebral, mania e neuroinflamação (KIM *et al.*, 2010; MIN *et al.*, 2011; CHAVES *et al.*, 2020; SOARES *et al.*, 2021).

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do extrato de *Rubus* sp. em mecanismos associados ao desenvolvimento e à progressão da DA utilizando dois modelos pré-clínicos da DA: um deles induzido por escopolamina (SCO) e outro por estreptozotocina (STZ) em ratos Wistar machos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito neuroprotetor do extrato de *Rubus* sp. em parâmetros comportamentais e bioquímicos em modelos pré-clínicos da DA em ratos Wistar machos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* do extrato *Rubus* sp. em homogeneizados de cérebro total exposto ao peróxido de hidrogênio e sulfato de ferro;
- Avaliar o potencial terapêutico do extrato de *Rubus* sp. e donepezil em um protocolo experimental de amnesia induzido por SCO através dos seguintes parâmetros:
 - Atividade locomotora através do teste do campo aberto;
 - Memória através do teste de reconhecimento de objetos;
 - Atividade da AChE em córtex cerebral, hipocampo e cerebelo;
 - Parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral, hipocampo e cerebelo.
- Avaliar o potencial terapêutico do extrato de *Rubus* sp. e metformina em um protocolo experimental de doença esporádica do tipo Alzheimer induzido por STZ através dos seguintes parâmetros:
 - Atividade locomotora pelo teste do campo aberto;
 - Déficit de memória através do teste de reconhecimento de objetos e do labirinto em Y;
 - Parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral, hipocampo e cerebelo;
 - Atividade da AChE em córtex cerebral, hipocampo e cerebelo;
 - Níveis de glicose em soro e insulina em soro e líquido cefalorraquidiano;
 - Nível da p-Tau em hipocampo e córtex cerebral;
 - Níveis de IL-6 e interleucina 10 (IL-10) em hipocampo e córtex cerebral;
 - Expressão gênica em hipocampo.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Doença de Alzheimer

A demência é um termo utilizado para descrever um grupo abrangente de doenças caracterizado pela perda de múltiplas funções cerebrais, sendo principalmente associadas a perda de memória, raciocínio, orientação, competências sociais e emocionais, bem como, pelo declínio cognitivo significativo (DMS-5, 2014). As manifestações do tipo demenciais podem ser por diversas causas, sendo elas a demência vascular, demência mista, demência com corpos de Lewy e a Doença de Alzheimer (DA). Destas, a DA destaca-se por ser a causa mais comum sendo responsável por cerca de 70% dos casos de demência em idosos (IZQUIERDO *et al.*, 2004; DMS-5, 2014; ALZHEIMER ASSOCIATION, 2021).

Tendo em vista o aumento da longevidade, concomitante ao aumento significativo da incidência de doenças crônicas e incapacitantes, estimou-se atualmente, que 55 milhões de pessoas em todo o mundo apresentam algum tipo de demência. Além disso, prevê-se que até 2050, existam cerca de 115 milhões de pessoas acometidas pela demência, das quais cerca de 30% dos indivíduos acima de 65 anos sejam afetados pela DA (SHI *et al.*, 2022). No Brasil, apesar da escassez de dados sobre o número de pessoas acometidas pela DA, é estimado que cerca de 1 milhão de pessoas apresentem a doença (ALZHEIMER ASSOCIATION, 2021; INSTITUTO DO ALZHEIMER BRASIL, 2021).

A DA foi descrita pela primeira vez, em 1906, pelo médico psiquiatra e neuropatologista alemão Alois Alzheimer, como uma doença de profunda perda de memória e alterações cerebrais microscópicas. Observou-se na época, que existiam alterações muito semelhantes às encontradas em cérebro de idosos, entretanto, em maior quantidade e mostrando-se mais acentuadas em hipocampo (HIPPIUES; NEUNDORFER, 2003; ALZHEIMER ASSOCIATION, 2021). Atualmente, a DA é classificada como uma doença neurodegenerativa progressiva, caracterizada pelo declínio constante da memória, deficiências cognitivas e mudanças de comportamento e personalidade. Ainda, esta doença leva a alterações cognitivas graves o suficiente para interferir nas habilidades diárias dos indivíduos acometidos por essa desordem neurodegenerativa

(ALZHEIMER ASSOCIATION, 2021; INSTITUTO DO ALZHEIMER BRASIL, 2021, PASSERI *et al.*, 2022).

A DA progride lentamente, passando por estágios que são descritos como leve, moderado e grave. No estágio leve, o paciente passa a esquecer experiências que acabou de vivenciar, nomes das pessoas e até mesmo sofrer confusão do espaço-tempo. No estágio moderado, a demência passa a ser mais pronunciada, levando ao esquecimento do próprio nome e história pessoal, bem como, a confusão nas atividades cotidianas, mudança de humor, delírios, comportamento compulsivo e problemas urinários e intestinais. O estágio avançado ou grave é considerado o estágio final da doença, no qual o indivíduo perde a capacidade de responder ao seu ambiente, sofre alterações nas habilidades físicas e apresenta dificuldade para se comunicar e torna-se mais vulnerável a infecções (IZQUIERDO *et al.*, 2004; ALZHEIMER ASSOCIATION, 2021).

Existem duas formas da DA, sendo uma delas a Familiar, denominada de FAD (do inglês, *Familial Alzheimer's Disease*). Essa forma é de caráter hereditário, atingindo cerca de 5 a 10% dos pacientes e apresenta um início precoce, acometendo indivíduos em torno de 40 a 50 anos de idade. A outra forma da DA é a idiopática, denominada LOAD (do inglês, *Late Onset Alzheimer's Disease*), no qual o início é mais tardio quando comparado com a FAD. A LOAD ocorre geralmente em indivíduos com mais de 60 anos de idade e é responsável pela maioria dos casos da doença. Uma pessoa com DA vive em média de quatro a oito anos após o diagnóstico da doença, entretanto, este tempo pode aumentar para até 20 anos, dependendo do manejo do paciente e da progressão dos sintomas (CREWS; MASLIAH, 2010; ALZHEIMER ASSOCIATION, 2021).

A DA ainda não tem cura e os tratamentos disponíveis atualmente, visam apenas retardar o declínio funcional do paciente. As terapias farmacológicas para o tratamento da DA são principalmente os anticolinesterásicos como por exemplo, o donepezil, rivastigmina e a galantamina, e a memantina que é um fármaco antagonista dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (BRIGGS *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2018; ATRI *et al.*, 2019). O donepezil é o fármaco de primeira escolha utilizado para o tratamento da DA. É um inibidor de colinesterases de segunda geração, e a eficiência do tratamento se dá pela boa

penetração deste fármaco na barreira hemato-encefálica e pela baixa toxicidade. O mecanismo de ação do donepezil se dá pela inibição da hidrólise da acetilcolina (ACh), aumentando assim, a disponibilidade deste neurotransmissor na fenda sináptica o que leva a uma melhora nos déficits cognitivos dos pacientes com DA (ATRI *et al.*, 2019). Apesar da sua eficácia, este fármaco pode causar alguns efeitos adversos como náuseas, vômitos, diarreia e anorexia; oscilação da pressão arterial, arritmia, bradicardia; dentre outros sintomas como tonturas, agitação e insônia (BRIGGS *et al.*, 2016; ATRI *et al.*, 2019; PASSERI *et al.*, 2022). Ainda, grande parte dos pacientes se tornam refratários a este medicamento e também podem sofrer efeitos secundários indesejados (KUMAR *et al.*, 2018; ALZHEIMER ASSOCIATION, 2021).

Depois de mais de 20 anos sem avanços na área de novos fármacos para o tratamento da DA, em 2021 e no início de 2023, foram aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA), o Aduhelm (aducanumab) e o Leqembi (lecanemab-irmb) (FDA, 2021; FDA, 2023). Estes fármacos são anticorpos monoclonais, e são os primeiros tratamentos destinados a atuar na fisiopatologia subjacente da DA, sendo capazes de reduzir as placas cerebrais do peptídeo β -amilóide (FDA, 2021). Entretanto, apesar desta nova classe de medicamentos ser promissora, ela ainda não fornece a cura da doença, mas é capaz de retardar a progressão e aumentar a expectativa de vida dos indivíduos acometidos pela DA (MUKHOPADHYAY; BANERJEE, 2021). Entretanto, cabe mencionar que os custos envolvidos neste tratamento são bastante elevados, o que limita o acesso dos pacientes a medicação e o seu uso no Brasil ainda não foi aprovado (FDA, 2021; FDA, 2023).

3.2 Mecanismos envolvidos na Doença de Alzheimer

Após mais de um século da descoberta da DA, sua etiologia ainda não está completamente elucidada. Sabe-se que DA tem origem multifatorial incluindo fatores tanto ambientais quanto genéticos (PASSERI *et al.*, 2022). Ao longo dos anos alguns mecanismos têm sido associados ao desenvolvimento e a progressão da DA, dentre estes pode-se citar: a deposição do peptídeo β A, hiperfosforilação da p-Tau, formação dos emaranhados neurofibrilares (NTF, do inglês, "*neurofibrillary tangles*"), disfunções no sistema colinérgico, estresse

oxidativo, neuroinflamação e alteração no metabolismo de glicose cerebral (CHEN, 2018; HAMPEL, 2018; PASSERI *et al.*, 2022).

3.2.1 Peptídeo β -amilóide e a hiperfosforilação da proteína Tau

A deposição do peptídeo β A é uma das principais características observadas na DA. Este fato ocorre de forma fisiológica no organismo ao longo do envelhecimento, entretanto, na DA, a clivagem deste peptídeo é aumentada e a produção exacerbada do peptídeo β A inicia uma cascata de eventos que levam à demência do tipo Alzheimer (CHEN, 2018).

Conforme demonstrado na Figura 1, na via amiloidogênica, o peptídeo β A é gerado a partir da proteína precursora amiloide (APP, do inglês “*amyloid precursor protein*”), uma proteína de membrana com uma região amino-terminal extracelular. A clivagem da APP ocorre através da atividade proteolítica pela β -secretase, seguido pela clivagem do complexo enzimático da γ -secretase, do qual é constituído pelas proteínas presenilinas 1 e 2 e demais proteínas (HAASS; SELKOE, 2007). Os peptídeos β A formados, acabam por se depositar no meio extracelular, formando placas, e prejudicando a morfologia e a função das sinapses (GOEDERT; SPILLANTINI, 2012). Ainda, a agregação anormal das placas de peptídeo β A produz produtos tóxicos, que acabam por danificar os microtúbulos, estruturas que fazem parte do citoesqueleto celular (KAMAT *et al.*, 2014).

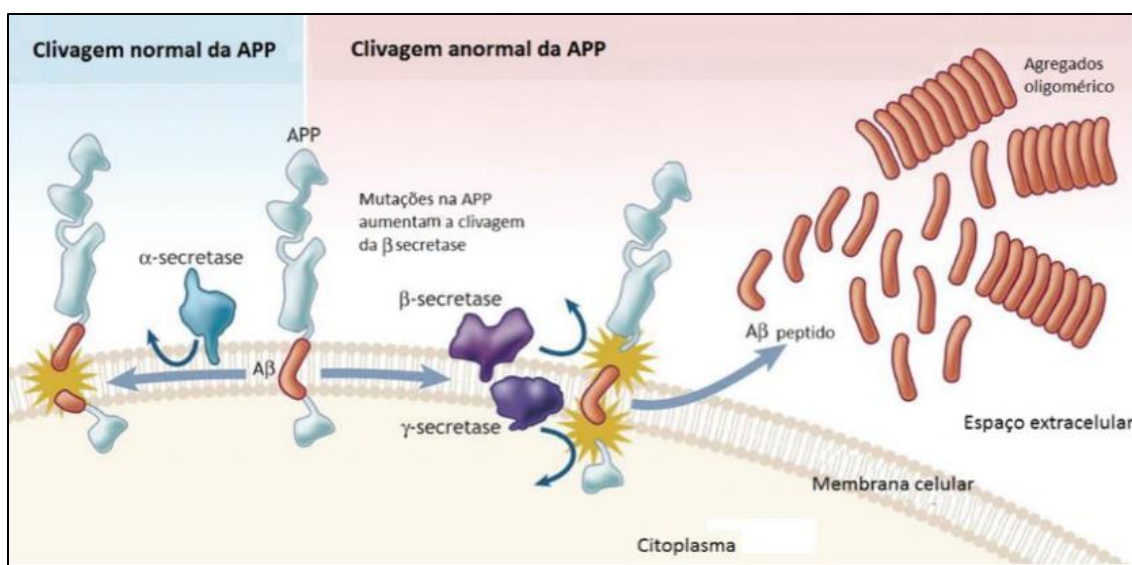


Figura 1: Processo de clivagem da proteína precursora amiloide (APP). Fonte: Adaptado de Patterson *et al.*, 2008.

A p-Tau é uma proteína solúvel, predominantemente expressa em axônios. Essa proteína possui grande importância na estabilização dos microtúbulos e a sua regulação ocorre através do processo de fosforilação. Quando hiperfosforilada, se torna insolúvel e com isso deixa de ligar-se aos microtúbulos gerando a formação de filamentos que se unem formando os NTF (REVETT *et al.*, 2013). Os NFT's são formados a partir da quebra do citoesqueleto neuronal, decorrente da hiperfosforilação da p-Tau, conforme mostrado na Figura 2. Entretanto, apesar de não se conhecer o mecanismo exato da formação das placas senis e dos NTF, sabe-se que estas alterações levam consequentemente à perda neuronal e a uma diminuição da massa encefálica (ANSOLEAGA *et al.*, 2015).

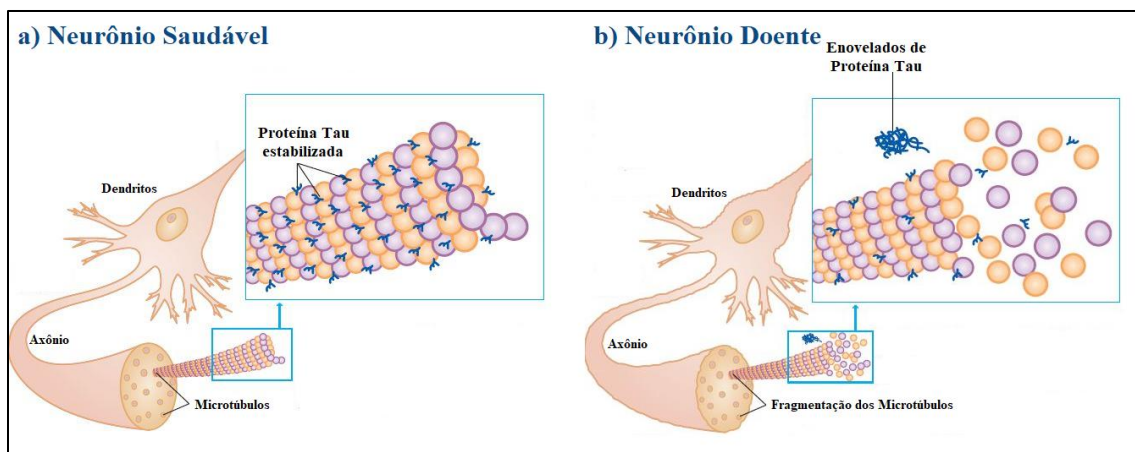


Figura 2: Processo de enovelamento da proteína Tau. Fonte: Autoria própria.

3.2.2 Sistema Colinérgico

O sistema colinérgico compreende uma ampla rede de neurônios responsáveis pela comunicação intracelular e transdução de sinal, envolvendo o neurotransmissor ACh, seus respectivos receptores e enzimas de síntese e degradação (KOUKOULI; CHANGEUX, 2020). A ACh é um neurotransmissor envolvido em processos fisiológicos como memória, atenção, sono e vigília, e principalmente, nos processos de aprendizagem (FERREIRA-VIERIA *et al.*, 2016). A ACh é sintetizada no citoplasma dos neurônios colinérgicos pré-sinápticos pela ação da enzima colina acetiltransferase (ChAT), a partir dos substratos colina e acetil-coenzima A (acetil-CoA). Após sintetizada, esta é

transportada através do transportador vesicular de ACh (VACHT) e armazenado em vesículas sinápticas. A sua liberação ocorre através da despolarização e sua consequente disponibilização para a fenda sináptica.

Na fenda sináptica, a ACh é hidrolisada principalmente pela enzima acetilcolinesterase (AChE) e em menor quantidade pela enzima butirilcolinesterase (BuChE) em acetato e colina. A colina pode ser recaptada pelo transportador de colina de alta afinidade (CHT1) para o neurônio pré-sináptico a fim de ser utilizada para síntese de novas moléculas de ACh (FERREIRA-VIERIA *et al.*, 2016) (Figura 3). A AChE é uma glicoproteína que desenvolve a importante função catalítica de modular os níveis de ACh e manter a homeostase da neurotransmissão colinérgica (HAMPEL *et al.*, 2018).

Considerando que disfunções no sistema colinérgico como a diminuição nos níveis da ACh ou aumento da atividade da AChE estão relacionados com o declínio da função cognitiva e comportamental, alterações relacionadas a este sistema passaram a ser apontadas como um dos fatores importantes envolvidos no desenvolvimento e progressão da DA (HAMPEL *et al.*, 2018). De fato, muitos estudos demonstraram uma perda significativa de neurônios colinérgicos em diferentes regiões cerebrais em pacientes com DA (CHAKRABORTY; DWAN, 2020). Assim, considerando a hipótese colinérgica da DA, fármacos foram desenvolvidos com potencial de inibir a atividade da AChE aumentando assim a ACh na fenda sináptica e consequentemente, promovendo uma melhora nos sintomas cognitivos de pacientes (BRIGGS *et al.*, 2016; HAMPEL *et al.*, 2018; PASSERI *et al.*, 2022). Desta forma, existem três fármacos anticolinesterásicos atualmente usados na terapia da DA: donepezil, a rivastigmina e a galantamina (BRIGGS *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2018; ATRI, 2019).

Cabe destacar que apesar destes fármacos não levarem à cura da DA, estes atuam em um sistema intimamente relacionado com a progressão da doença. Entretanto, tendo em vista que a DA é uma doença multifatorial, é necessário que sejam desenvolvidas novas terapias que atuem nas demais vias envolvidas no declínio da memória, para que assim, a progressão da doença seja mais lenta e o tratamento seja mais efetivo.

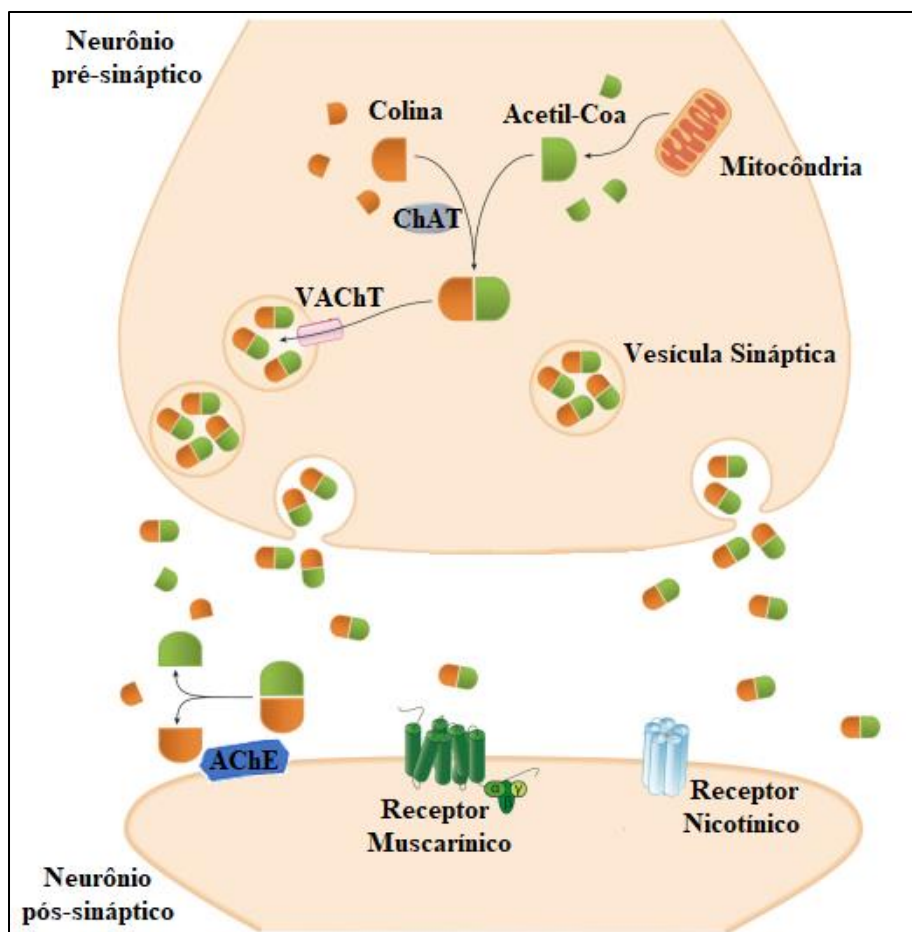


Figura 3: Representação do Sistema Colinérgico. Fonte: Adaptado de Ferreira-Vieira *et al.*, 2016.

3.2.2 Estresse Oxidativo

Espécies reativas são átomos ou moléculas instáveis, os quais possuem elétrons desemparelhados na última camada de valência, tornando-se altamente reativos. Durante a produção de energia, espécies reativas são geradas de forma natural no organismo, através das diversas reações metabólicas e fisiológicas (HALLWELL, 2006). As espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) desempenham importantes funções como a defesa celular contra infecções e processos de sinalização celular (FORRESTER *et al.*, 2018). Dentre as ERO pode-se citar o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Já em relação as ERN, pode-se citar o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) (Figura 4) (HALLWELL, 2006).

O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre compostos pró-oxidantes e antioxidantes que pode gerar danos irreversíveis às biomoléculas e levar a disfunção celular e tecidual (LJUBISAVLJEVIC, 2016).

Entretanto, o organismo possui um mecanismo antioxidante composto por sistemas não-enzimáticos, como vitaminas, e por enzimas endógenas, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione S-transferase (GST) (FINKEL; HOLBROOK, 2000; BÓ *et al.*, 2015). A enzima SOD é responsável pela remoção do $O_2^{\cdot -}$ convertendo-o em H_2O_2 . A CAT dismuta o H_2O_2 transformando-o em O_2 e H_2O (Figura 4). A GPx também auxilia no processo de decomposição e remoção do H_2O_2 , utilizando a glutathione reduzida (GSH) como cofator, contribuindo para uma menor formação de $OH^{\cdot}$ (WINIARSKA-MIECZAN, 2018). Assim como a GPx, a GST também utiliza a GSH como cofator. A GST é uma enzima envolvida no processo de detoxificação celular, protegendo a célula contra os radicais livres, seus subprodutos e xenobióticos, a fim de torná-los menos tóxicos e mais facilmente degradados, exercendo assim, uma atividade antioxidante para os tecidos (HAYES; MCLELLAN, 1999). A peroxidação lipídica passa a ser uma consequência do estresse oxidativo e reflete na oxidação de ácidos graxos insaturados nas membranas biológicas, alterando assim sua funcionalidade. Sendo assim, destacam-se as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como um marcador da peroxidação lipídica.

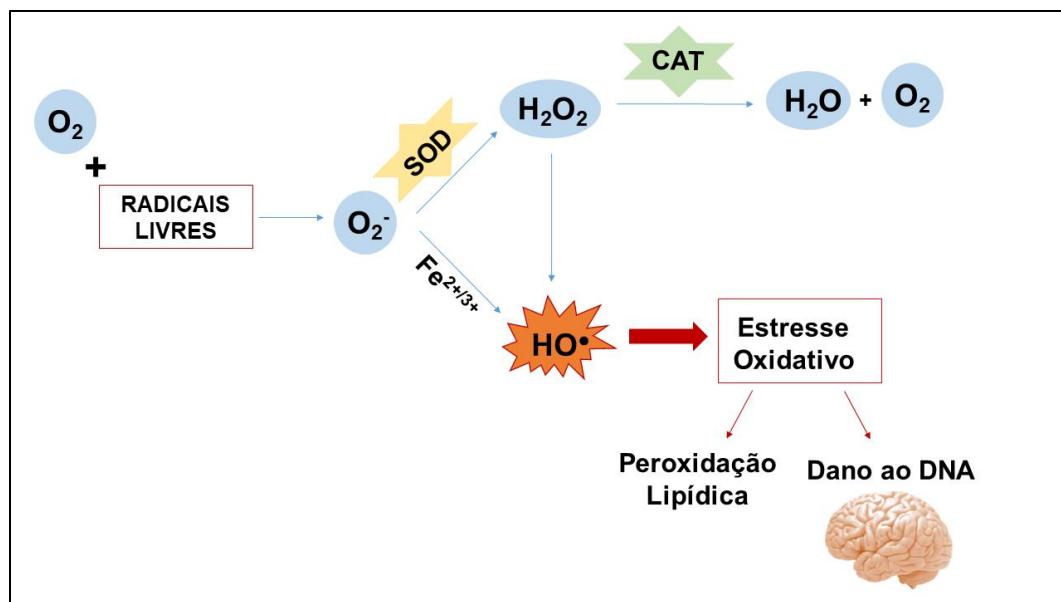


Figura 4: Esquema representativo do estresse oxidativo no cérebro. Fonte: Autoria própria.

Assim, tem sido bem estabelecido na literatura que o estresse oxidativo contribui para a fisiopatologia de doenças que acometem o SNC, dentre elas as psiquiátricas e neurodegenerativas, como a DA (GAZAL *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2018; PACHECO *et al.*, 2018; SPOHR *et al.*, 2020; TEIXEIRA *et al.*, 2020). Em estudos utilizando modelos animais de demência induzido por STZ, já foi demonstrado que ocorre um aumento nos níveis de ERO e nitritos e um aumento nos níveis de TBARS. Ainda, observa-se que ocorre um aumento na atividade da enzima antioxidante SOD, bem como uma redução na atividade da CAT e da GPx (GUTIERRES *et al.*, 2014; PACHECO *et al.*, 2018; TEIXEIRA *et al.*, 2020). Ademais, estudos em humanos também já observaram alterações decorrentes do processo oxidativo no cérebro de pacientes com DA. Neste sentido, já foi observado um aumento nos níveis de TBARS e redução nos níveis das enzimas CAT e SOD, avaliadas em córtex frontal, temporal e cerebelo em tecido cerebral *pós-mortem* de pacientes com DA. Em outro estudo em que avaliou-se estresse oxidativo no plasma de pacientes com DA, foi possível observar um aumento nos níveis de TBARS e na atividade da SOD, bem como uma redução na GSH, GPX e na atividade da CAT (MARCUS *et al.*, 1998; PUERTAS *et al.*, 2012).

Cabe destacar que apesar das ERO serem normalmente formadas como um mecanismo fisiológico, o acúmulo de altos níveis destas espécies devido a uma superprodução ou depuração inadequada, acaba por interromper a neurogênese. Neste sentido, a sobrecarga de ERO contribui nos processos de neurodegeneração, neuroinflamação e envelhecimento (YUAN *et al.*, 2015; MISHRA *et al.*, 2018).

3.2.3 Neuroinflamação

O processo neuroinflamatório é importante para a defesa e integridade do SNC e ocorre através de mediadores produzidos por células como astrócitos e micróglia. Estas células regulam a inflamação em resposta a estímulos prejudiciais com o objetivo de restaurar a homeostase. Entretanto, quando ocorre uma reação inflamatória exacerbada, esta acaba por gerar danos teciduais através da liberação de mediadores químicos inflamatórios levando a processos neurodegenerativos (LATTA; BROTHERS; WILCOCK, 2014; HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015).

A deposição do peptídeo β A e os NTF encontrados na DA têm sido associados a ativação da micróglia e dos astrócitos (SASTRE *et al.*, 2008). O peptídeo β A pode ligar-se a receptores específicos e desencadear uma resposta imune inata que acarreta na liberação de mediadores inflamatórios que contribuem para o agravamento e progressão da patologia (GRAY; KINGHORN; WOODLING, 2020). A ativação microglial promove a produção de fatores pró-inflamatórios, como a interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 ($IL-1\beta$) e interleucina 12 (IL-12) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), radicais livres e neurotoxinas que promovem a disfunção do sistema imune, e reduzem a produção da citocina anti-inflamatória interleucina 10 (IL-10), exacerbando a resposta neuroinflamatória (RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ, 2012).

Estudos clínicos já demonstram um aumento da citocina IL-6 tanto em fluido cerebrospinal quanto em plasma de pacientes com DA (BELOOSESKY *et al.*, 2002; LLANO *et al.*, 2012; D'ANNA *et al.*, 2017; TAIPA *et al.*, 2019). Entretanto, citocinas que desempenham ação anti-inflamatória como a IL-10, contribuem para uma supressão de citocinas pró-inflamatórias, inibindo os marcadores de ativação. É importante destacar que em um modelo animal de neuroinflamação, observou-se que a IL-10 regulou a ativação de NADPH oxidase (NOX) e a expressão de mediadores pró-inflamatórios. Assim, em um modelo experimental de demência induzido por STZ, também foi observado que a IL-10 contribuiu para regulação de NOX, sugerindo assim, que a IL-10 contribui para o mecanismo de neuroproteção (RAVELLI *et al.*, 2017). Sendo assim, destaca-se que a IL-10 é uma importante citocina para a homeostase, neuroproteção, neurogênese e plasticidade sináptica (ZHOU *et al.*, 2009; FOUDA *et al.*, 2013; PEREZ-ASENSIO *et al.*, 2013; TALAAT *et al.*, 2016).

3.2.4 Metabolismo de glicose no cérebro

Uma outra teoria que vem sendo relacionada com a DA é a alteração no metabolismo de glicose e a diminuição dos receptores de insulina (RI) cerebrais, uma vez que a sinalização de insulina diminui com o envelhecimento e pode estar associado à um declínio cognitivo e aos processos inflamatórios (DE LA TORRE, 2008). Corroborando com isto, estudos epidemiológicos reportam que

pacientes diabéticos apresentam problemas de memória e ainda, uma maior susceptibilidade em desenvolver a DA (STEEN *et al.*, 2005; MCNAY *et al.*, 2010).

Os receptores de insulina estão presentes no tecido cerebral sugerindo que a insulina possui um importante papel neste tecido. Tem sido relatado na literatura que a insulina regula o metabolismo de glicose cerebral, plasticidade, neurogênese e a manutenção das funções cognitivas (AIR *et al.*, 2002, ZHAO; ALKON, 2001; MAN *et al.*, 2000; AHMADIAN *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2011, LLORENS-MARTIN *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2009; GUO *et al.*, 2010; FERNANDEZ; TORRES-ALEMAN, 2012). Desta forma, estudos tem relatado que alterações cerebrais nos níveis de insulina ou a diminuição dos RI estariam relacionados com o desenvolvimento e a progressão da DA (GHASEMI *et al.*, 2013).

A insulina cerebral é majoritariamente obtida da corrente sanguínea, a qual atravessa a barreira hematoencefálica por um sistema de transporte sinalizado por RI localizadas nas células endoteliais dos vasos sanguíneos que irrigam o SNC (BLAZQUEZ *et al.*, 2014). No SNC, a insulina tem maior afinidade pelos seus RI, mas também liga-se nos receptores do tipo fator de crescimento semelhante a insulina (IGF, do inglês, “*insulin growth factor*”) (LIU *et al.*, 2011). Os RIs desencadeiam cascatas de sinalização intracelular através da fosforilação do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1, do inglês, “*insulin receptor substrate 1*”), que quando fosforilado ativa a sinalização da via fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K – Akt, do inglês “*phosphoinositide 3-kinase*”), no qual consequentemente, inibe a enzima glicogênio sintase quinase 3 β (GSK-3 β , do inglês, “*glycogen synthase kinase 3 beta*”) (Figura 5) (FERNANDEZ; TORRES-ALEMAN, 2012; MULLER *et al.*, 2012; BLAZQUEZ *et al.*, 2014). Cabe ressaltar que quando ativada, a GSK-3 β é uma quinase responsável pela hiperfosforilação da p-Tau que contribui para o acúmulo de NTF's observados na DA. Ainda, a alteração na sinalização da insulina acelera a produção de β A no SNC, aumentando o processamento amiloidogênico da APP e corroborando com o aumento da produção e acúmulo de β A (BLAZQUEZ *et al.*, 2014). Sendo assim, a diminuição dos RIs cerebrais tem sido fortemente relacionado com os déficits no aprendizado e memória encontrados durante o envelhecimento, e consequentemente relacionado com as alterações que ocorrem nos indivíduos acometidos pela DA (BLAZQUEZ *et al.*, 2014).

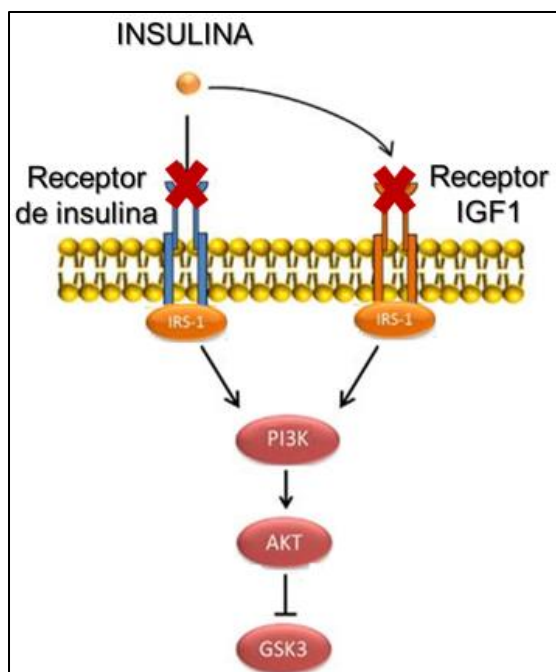


Figura 5: Representação da cascata de sinalização de insulina intracelular.
Fonte: Autoria própria.

Em cérebros de pacientes com diabetes mellitus do tipo 1 (DM1), DM do tipo 2 (DM2) e com resistência à insulina foi observado que estes indivíduos apresentam características moleculares e celulares cerebrais semelhantes às de idosos e de pacientes com DA. Sendo assim, este fato levou a hipótese de que a DA pudesse ser uma doença de alteração metabólica no SNC (AL HAJ AHMAD, 2018; KANDIMALLA; THIRUMALA; REDDY, 2017). Embora estes fatores ainda não estejam bem esclarecidos, estudos epidemiológicos e fisiopatológicos sugerem que o DM2 pode predispor à DA uma vez que ambas as condições apresentam resistência à insulina e alterações bioquímicas semelhantes, as quais podem estar associados ao comprometimento cognitivo (GUPTA; BISHT; SANKAR, 2011; MARKOWICZ *et al.*, 2017). Considerando essas alterações observadas na DA em relação ao metabolismo da glicose e insulina, estudos clínicos e pré-clínicos têm avaliado a eficácia do tratamento com metformina para o tratamento desta desordem neurodegenerativa. A metformina é um fármaco pertencente à classe das biguanidas, é um dos agentes antidiabéticos mais utilizados. Este, atua diminuindo síntese hepática de

glicose e melhorando a sensibilidade dos receptores à insulina, contribuindo então para a diminuição da glicemia e da hiperinsulinemia (WANG, 2002).

Estudos prévios têm demonstrado que o uso da metformina foi capaz de reverter o aumento da expressão da p-Tau, da GSK-3 β , níveis de estresse oxidativo, citocinas pró-inflamatórias, bem como de atenuar o declínio cognitivo em modelo experimental da DA sugerindo que a metformina pode ser um fármaco promissor para retardar a progressão desta desordem neurodegenerativa (KESHAVARZI *et al.*, 2019; PILIPENKO *et al.*, 2020). Também foi possível observar que a metformina reverte os danos causados na memória dos animais pela indução de amnésia ou demência por SCO e STZ, respectivamente (MOSTAFA *et al.*, 2016; PILIPENKO *et al.*, 2020; SAFFARI *et al.*, 2020). Ainda, foi possível observar a permeabilidade do fármaco na barreira hematoencefálica, uma vez que é demonstrada a modulação da atividade da AChE em um modelo animal induzido por STZ e de reduzir os níveis do peptídeo β A e p-Tau em homogeneizado cerebral (NASSAR *et al.*, 2018; PILIPENKO *et al.*, 2020). Por fim, estudos em humanos demonstram que o uso da metformina em indivíduos sem diabetes para a prevenção da demência ainda não são suportados pelas evidências atualmente disponíveis. Entretanto, em pacientes diabéticos, já foi possível observar uma melhora na cognição e na memória naqueles pacientes que fazem o tratamento com metformina, quando comparado com pacientes que não fazem o controle do diabetes (CAMPBELL *et al.*, 2018; KOO *et al.*, 2019; POMILIO *et al.*, 2022).

Sendo assim, sabendo-se da crescente busca por novos fármacos e compostos que atuem nos diversos fatores envolvidos com a DA, os produtos naturais tornam-se alvos interessantes de pesquisa, uma vez que tem sido observados efeitos benéficos e multialvos em diferentes patologias (CARDOSO *et al.*, 2017; PACHECO *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2018; SPOHR *et al.*, 2020).

3.3 Produtos Naturais

Uma alternativa farmacológica promissora que vêm sendo amplamente estudada em diversas doenças são os produtos naturais (SPOHR *et al.* 2018; OLIVEIRA *et al.* 2020; SOARES *et al.*, 2021). Dentre estes, pode-se citar os compostos fenólicos, que são a maior classe de compostos naturais, sendo esta,

subdividida em ácidos fenólicos, flavonoides e não flavonoides (FOLMER *et al.*, 2014).

Dentro da classe dos flavonoides, existe ainda uma classe de metabólitos secundários denominada de antocianinas que possuem atividades farmacológicas como ação anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana e antidiabética (BASU *et al.*, 2010; BURTON-FREEMAN *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2012; SUBASH *et al.*, 2014; DENARDIN *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2016). As antocianinas são hidrossolúveis e estão em maior concentração em frutos que apresentam coloração roxa e avermelhada. Estas, são encontradas na natureza, principalmente, na forma de heterosídeos, os quais são formados por uma aglicona, denominada antocianidina, que possui como estrutura básica, o núcleo 2-fenilbenzopirilo, o qual é formado por um anel aromático ligado a um anel heterocíclico, que por sua vez, está ligado a um terceiro anel aromático (HE; GIUSTI, 2010).

Dentre as espécies ricas em antocianinas, pode-se citar a *Rubus* sp., uma fruta do gênero *Rubus*, que está inserido na família Rosaceae. Conhecida popularmente como amora preta, esta fruta apresenta coloração roxa e seu cultivo foi originário nos Estados Unidos da América. Entretanto, suas cultivares foram adaptadas ao clima da região sul do Brasil, aos quais apresentam alta produtividade, sendo o estado do Rio Grande do Sul, o maior produtor brasileiro deste fruto (DAUBENY, 1996; ANTUNES; PERES, 2013; ANTUNES; RASSEIRA, 2004).

A amora preta apresenta sabor diferenciado entre a acidez e a doçura, e as propriedades funcionais são os principais atrativos desta fruta (MOTA, 2006). Além disso, apresenta em sua composição, cerca de 85% de água, 10% de carboidratos, vitaminas do complexo A e B e compostos bioativos. Os fitoquímicos como o ácido elágico, ácido fólico e minerais estão presentes na composição da amora preta, e ainda é uma fonte rica em compostos fenólicos, como as antocianinas, flavonoides e ácidos fenólicos (HIRSCH *et al.*, 2012; DE SOUZA *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2015). Estes compostos fenólicos presentes na amora, conferem alta atividade antioxidante, uma vez que este parâmetro está relacionado com o conteúdo total de fenólicos e antocianinas encontrados nas frutas. As antocianinas majoritárias encontradas na amora preta são a cianidina-3-galactosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo, entretanto,

encontra-se em menor quantidade a cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3-xilosídeo e cianidina-3-arabnosídeo (SIRWOHARN *et al.*, 2004; SELLAPPAN *et al.*, 2002; SUBASH *et al.*, 2014; AFZAL; REDHA; ALHASAN, 2019; CHAVES *et al.*, 2020). Devido ao alto teor de umidade que a amora preta apresenta, o tempo de vida pós-colheita passa a ser relativamente curto, culminando em menor consumo da fruta *in natura*. Portanto, a utilização desta fruta na forma processada vem sendo amplamente utilizada, como por exemplo, em iogurtes, geleias, suplementos dietéticos, polpas, dentre outros (ANTUNES *et al.*, 2003).

No ramo da pesquisa, foi observado que o uso da antocianina isolada cianidina-3-glicosídeo causa uma melhora na memória de ratos diabéticos induzidos por STZ (NASRI *et al.*, 2012). Ainda, os efeitos biológicos dos extratos brutos concentrados de antocianinas têm demonstrado efeitos anti-inflamatórios, antimicrobiano, antioxidante, reduz o risco de obesidade e síndrome metabólica, bem como, apresenta atividade anti-maníaca em modelos animais (ÇOBAN; BIYIK, 2010; KASTER *et al.*, 2015; CARVALHO, *et al.*, 2016; CARDOSO *et al.*, 2017; PACHECO *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2018; SPOHR *et al.*, 2020).

Entretanto, apesar do conhecimento dos efeitos benéficos dos extratos ricos em antocianinas, existem poucos relatos na literatura sobre o fruto de *Rubus* sp. Estudos com o extrato de amora preta foram avaliados em um modelo de mania induzido por cetamina e um modelo de neuroinflamação induzido por lipopolissacarídeo (LPS). No modelo de mania, foi utilizado o extrato de *Rubus* sp. (200 mg/kg), por 14 dias e observou-se uma redução nos níveis de ERO, nos níveis de IL-6 e de AChE, ainda, houve um aumento nos níveis de IL-10 e uma redução na hiperlocomoção dos animais (CHAVES *et al.*, 2020). No estudo de neuroinflamação, os autores também utilizaram a dose de 200 mg/kg de extrato de amora preta por 14 dias. Foi observado uma melhora no estresse oxidativo em diferentes estruturas cerebrais e uma redução na atividade da AChE em córtex cerebral (SOARES *et al.*, 2021). Sendo assim, o extrato do fruto de amora preta apresentou atividades diversas nos modelos em que foi utilizada, demonstrando ser um tratamento promissor no tratamento de doenças que acometem o SNC. Desta forma, é importante ressaltar que este é o primeiro estudo visando avaliar o extrato de *Rubus* sp. em modelos animais da DA.

3.4 Modelos animais utilizados na avaliação da DA

Considerando algumas dificuldades em relação aos estudos clínicos de DA tais como o estabelecimento de um grupo controle que não apresente alterações cognitivas em função da idade e também, pela dificuldade em detectar a DA em fases iniciais da doença, os modelos animais utilizando roedores têm sido amplamente utilizados no ramo da pesquisa, uma vez que apresentam facilidade de reprodução e manuseio, além do comportamento dos animais ser amplamente estudado e bem conhecido (CHAVETTE-PALMER; TARRADE, 2016). Dentre os modelos animais mais utilizados para avaliação de mecanismos relacionados a DA pode-se citar o modelo de amnésia induzido por SCO e o modelo de demência esporádica induzido por STZ (KNEZOVIC *et al.*, 2015; TANG, 2019).

A SCO é uma amina terciária da classe dos alcaloides da beladona. É uma substância anticolinérgica bloqueadora de receptores colinérgicos muscarínicos na membrana pós-sináptica, reduzindo assim a ação da ACh. Assim, a SCO tem sido utilizada como um modelo de amnésia para investigar alterações de memória que também são observadas na DA, uma vez que foi observado que os processos amnésicos produzidos pela administração de SCO são comparáveis aos que acontecem no envelhecimento (DONALD *et al.*, 1994; TANG, 2019). Uma das vantagens do modelo de SCO é que ele fornece uma maneira simples e rápida para testar as propriedades de novos medicamentos visando a melhora da cognição (TANG, 2019). Ainda, a SCO se torna uma boa alternativa para avaliação de memória a curto prazo.

O modelo de SCO pode ser induzido por uma injeção intraperitoneal de 1 a 3 mg/kg, no qual seus efeitos na disfunção colinérgica podem ser observados 30 minutos após a administração da droga (GUTIERRES *et al.*, 2012; AKSOZ *et al.*, 2019; TANG, 2019). Uma vez que a SCO causa déficits no sistema colinérgico e este está relacionado com alterações na memória e aprendizado, a SCO se torna alvo de grande importância no uso de modelos animais, tendo em vista que a droga mimetiza nos animais algumas características já conhecidas na DA. Cabe destacar que o uso desse modelo se torna interessante na avaliação da DA de grau leve a moderado, uma vez que é nesse período da doença que ocorrem os primeiros indícios de déficits de memória.

A STZ é um composto natural, produzido pela bactéria *Streptomyces acromogenes* e foi relatado seus efeitos diabetogênicos no ano de 1963, uma vez que apresentava ação citotóxica às células β pancreáticas. A STZ é uma glicosamina derivada de nitrosoureia e tem sido amplamente utilizada em modelos de diabetes uma vez que apresenta ação inibidora na secreção de insulina no pâncreas. O fármaco é captado pelas células β pancreáticas através dos transportadores de glicose do tipo 2 (GLUT2). Entretanto, os diferentes tipos de GLUT também estão presentes em regiões cerebrais e quando a STZ é administrada no encéfalo, acaba por dessensibilizar os receptores de insulina. Embora o mecanismo de ação da STZ no cérebro ainda não tenha sido bem elucidado, é possível observar que seu potencial tóxico quando administrada por via intracerebroventricular gera efeitos bioquímicos, fisiopatológicos e comportamentais semelhantes aos que ocorrem na DA. Dentre esses efeitos estão a resistência à insulina, déficit no metabolismo da glicose, neuroinflamação, acúmulo da p-Tau e peptídeo β A e déficits relacionados ao aprendizado e a memória (RAVELLI *et al.*, 2017).

O modelo do STZ é baseado no comprometimento metabólico de glicose observados após o início clínico da DA. Assim, a utilização de doses subdiabetogênicas de STZ, variando entre 1 a 3 mg/kg, quando injetadas no cérebro dos animais, altera o metabolismo de glicose no SNC, sem alterar os níveis basais de glicose na corrente sanguínea (GUTIERRES *et al.*, 2014). Este modelo tende a contribuir para a compreensão da DA esporádica em humanos, por possuir características da doença e mimetizar a progressiva deterioração cognitiva e do metabolismo energético do encéfalo. Destaca-se que o déficit causado pela STZ pode ser observado nos primeiros dias após a indução e demonstra um efeito agudo durante 1 mês. Ainda, foi destacado que nos déficits cognitivos deste modelo podem ser observados a memória de curta e de longa duração (CORREIA *et al.*, 2011; SHONESYA *et al.*, 2012; KNEZOVIC *et al.*, 2015).

Desta forma, o objetivo da presente tese foi investigar os efeitos do extrato da *Rubus* sp em modelos pré-clínicos da DA induzidos pela administração de SCO ou STZ em ratos. Ainda, considerando os mecanismos envolvidos em cada modelo experimental usamos o donepezil como fármaco padrão para o modelo da SCO devido ao mecanismo de indução de amnésia estar relacionada ao

sistema colinérgico, e a metformina para o modelo do STZ devido ao mecanismo de indução de déficit de memória estar relacionado ao metabolismo de glicose cerebral.

4. RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de 3 capítulos. No capítulo 1, será apresentado o artigo aceito; no capítulo 2, será apresentado o manuscrito submetido, e no capítulo 3, os resultados adicionais. As seções materiais e métodos, resultados, discussão e referências encontram-se no próprio artigo e manuscrito e representam a íntegra deste estudo. O artigo e o manuscrito estão estruturados de acordo com as revistas que foram publicados ou submetidos.

4.1 Capítulo 1

Therapeutic potential of blackberry extract in preventing memory deficits and neurochemical alterations in the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of a rat model with amnesia

Julia Eisenhardt de Mello, Karina Pereira Luduvico, Alessandra dos Santos, Fernanda Cardoso Teixeira, Juliane de Souza Cardoso, Mayara Sandrielly Soares de Aguiar, Wilson Cunico, Marcia Vizzotto, Francielli Stefanello e Roselia Spanevello

Status: Publicado no periódico *Metabolic Brain Disease*



Therapeutic potential of blackberry extract in the preventing memory deficits and neurochemical alterations in the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of a rat model with amnesia

Julia Eisenhardt de Mello¹ · Karina Pereira Luduvico¹ · Alessandra dos Santos¹ · Fernanda Cardoso Teixeira¹ · Juliane de Souza Cardoso¹ · Mayara Sandrielly Soares de Aguiar¹ · Wilson Cunico¹ · Marcia Vizzotto² · Francieli Stefanello¹ · Roselia Spanevello^{1,3} 

Received: 27 October 2022 / Accepted: 18 January 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

Abstract

The blackberry (*Rubus* sp.) is a popular fruit that has a high concentration of phenolic compounds. Pharmacological investigations have demonstrated the important biological activities of the blackberry extract, such as neuroprotective actions. This study aimed to evaluate the effects of blackberry extract on memory and neurochemical parameters in rats subjected to scopolamine (SCO)-induced amnesia. Male rats were divided into five groups: I, control (saline); II, SCO; III, SCO + *Rubus* sp. (100 mg/kg); IV, SCO + *Rubus* sp. (200 mg/kg); and V, SCO + donepezil (5 mg/kg). Blackberry extract and donepezil were orally administered for 10 days. On day 11, group I received saline, and groups II, III, IV, and V received SCO (1 mg/kg) intraperitoneally after object recognition behavioral training. Twenty-four hours after the training session, animals were subjected to an object recognition test. Finally, the animals were euthanized, and the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum were collected to evaluate the oxidative stress and acetylcholinesterase (AChE) activity. *Rubus* sp. extract prevented memory impairment induced by SCO in a manner similar to that of donepezil. Additionally, *Rubus* sp. extract and donepezil prevented the increase in AChE activity induced by SCO in all the evaluated brain structures. SCO induced oxidative damage in the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum, which was prevented by *Rubus* sp. and donepezil. Our results suggest that the antioxidant and anticholinesterase activities of *Rubus* sp. are associated with memory improvement; hence, it can potentially be used for the treatment of neurodegenerative diseases.

Keywords Blackberry · Scopolamine · Memory · Alzheimer's disease · Rats · Oxidative damage

Introduction

Plant natural products have been widely studied owing to the presence of compounds with potent pharmacological activities (Golovinskaia and Wang 2021). Among them, phenolic compounds, also known as secondary metabolites, are considered the most abundant class, especially phenolic acids, proanthocyanidins, anthocyanins, and other flavonoids (Folmer et al. 2014). Anthocyanins are water-soluble and are present in high concentrations in fruits that have a purple or red color, such as berries. The blackberry (*Rubus* sp.) belongs to the plant family Rosaceae and originates from the United States of America. However, its cultivars are well-adapted to the climate in the southern region of Brazil, showing high productivity (Daubeney 1996; Tavares et al. 2012; Antunes and Peres 2013).

✉ Roselia Spanevello
roselia.spanevello@ufpel.edu.br; rspanevello@gmail.com

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas-RS CEP 96010-900, Brazil

² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas, Brazil

³ Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos/Bioquímica, Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Prédio 29, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão Do Leão, S/N, Caixa Postal 354, Pelotas, RS CEP 9601090, Brazil

Blackberry fruits are commercially cultivated and are consumed in both fresh and processed forms. Pharmacological research has demonstrated the important biological activities of the blackberry extract, including anti-inflammatory (Velde et al. 2019), antithrombotic (Xie et al. 2017), and anticancer activities (Tatar et al. 2019). Considering the potential impact of consumption of berries on human health and disease, the neuroprotective effects of blackberries have been demonstrated in various experimental models of mania (Chaves et al. 2020), neuroinflammation (Soares et al. 2021), and cognitive function in aged rats (Shukitt-Hale et al. 2009). However, to our knowledge, the effects of blackberry fruit extract have not yet been evaluated in experimental models of Alzheimer's disease (AD).

AD is a neurodegenerative, progressive, and irreversible disorder characterized mainly by memory loss (Scheltens et al. 2021). The main pathophysiological characteristics of AD are the deposition of β -amyloid peptide, neurofibrillary tangles, and cholinergic deficits (Chen 2018; Scheltens et al. 2021). Additionally, brain insulin resistance has been associated with AD through various mechanisms, such as impaired glucose metabolism, increased inflammatory processes, and oxidative stress (Fernandez and Torres-Aleman 2012). Oxidative stress and its consequent cellular damage play crucial roles in neurodegeneration and cognitive decline, which are important mediators in the onset, progression, and pathogenesis of AD (Zhu et al. 2007). Therefore, it is imperative to evaluate the efficacy of antioxidant compounds in mitigating the effects of oxidative stress in the brain under pathological conditions.

The cholinergic system plays a crucial role in memory and cognitive functions, and AD is associated with a substantial loss of components of this system (Kasá et al. 1997). In recent years, although others important pathophysiological mechanisms involved in the onset and progression of AD have been reported, the restoration of cholinergic function is still critical for the management of AD patients (Hampel et al. 2018).

Acetylcholinesterase (AChE) inhibitors remain one of the most promising cholinergic therapeutic agents. AChE is responsible for hydrolyzing acetylcholine-regulating neurotransmitter levels in the synaptic cleft (Chu 2012). Thus, AChE inhibitors, such as donepezil, increase the acetylcholine levels to restore the cholinergic balance and improve memory (Sharma 2019). Nonetheless, the small number of drugs currently available for AD treatment with limited efficacy and potential side effects necessitate the exploration of other active compounds (McGleenon et al. 1999).

This study aimed to evaluate the antioxidant and anticholinesterase effects of blackberry fruit extract on the cortex, hippocampus, and cerebellum in a rat model with memory deficit induced by scopolamine (SCO). In addition, the

effects of blackberry fruit extract on memory improvement also were investigated.

Materials and methods

Animals and ethical procedures

Male Wistar rats (60-days-old, 250–300 g) were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Pelotas (Pelotas, RS, Brazil). The animals were kept at a constant temperature (22 ± 1 °C) under a light/dark cycle with free access to water and food. All animal experiments were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Pelotas (protocol number: 027350/2021–12).

Blackberry extract

Methanolic extract of *Rubus sp.* fruit was prepared, as described by Chaves et al. (Chaves et al. 2020). The *Rubus sp.* fruits (Tupy cultivar) were cultivated and made available by Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (EMBRAPA) in Pelotas, RS, Brazil ($31^{\circ}40'50.6''S$, $52^{\circ}26'23.1''W$). To prepare the extract, frozen blackberry fruits were sliced, 1 g of fruit was weighed, 60 mL of methanolic alcohol was added, and the mixture was subsequently placed in an ultrasound bath for 60 min. After sonication, the extract was filtered and placed in a freezer for 24 h, after which it was subjected to rotary evaporation to obtain the crude extract, which was later lyophilized, kept away from light, and stored in a freezer at -80 °C until use. The phytochemical composition of *Rubus sp.* fruit extract has previously been determined (Chaves et al. 2020). Anthocyanins were evaluated using high-performance liquid chromatography coupled to a photodiode array detector and a high-resolution mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source. The major anthocyanins identified were cyanidin-*O*-galactoside and cyanidin-*O*-rutinoside (Chaves et al. 2020).

In Vitro antioxidant potential of the *Rubus sp.* extract

In this experiment, we used whole brains of rats. The rat brains were homogenized in sodium phosphate buffer (pH 7.4) and centrifuged at 3500 rpm for 10 min. Oxidative damage was induced in vitro by adding 10 μ L hydrogen peroxide (H_2O_2) and 5 μ L ferrous sulfate ($FeSO_4$) to the brain tissue homogenate (225 μ L). To evaluate the antioxidant potential of the *Rubus sp.* extract, 10 μ L of the extract at different concentrations (10, 25, 50, 100, and 200 μ g/mL) was added to the mixture and incubated at 37 °C for 1 h. Ascorbic acid

(AA) was used as a standard antioxidant, and the following experimental conditions were evaluated: I-control (C): brain homogenate not exposed to $H_2O_2 + FeSO_4$; II-induced control (IC): brain homogenate exposed to $H_2O_2 + FeSO_4$; and III-IC plus treatments: brain homogenate exposed to $H_2O_2 + FeSO_4$ and treated with AA or blackberry extract. At the end of the experiment, an aliquot of the final homogenate was used to evaluate the oxidative stress parameters, such as reactive oxygen species (ROS), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), total sulfhydryl (SH) content, and superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities, according to the methodology described in this section.

Effects of the blackberry extract on the experimental model of amnesia induced by SCO

Fifty rats were divided into five experimental groups ($n=10$): I - Control (saline); II - SCO; III—SCO + *Rubus* sp. (100 mg/kg); IV - SCO + *Rubus* sp. (200 mg/kg); and V - SCO + donepezil (5 mg/kg). Blackberry extract and donepezil were orally administered to the animals for 10 days. On day 11, the animals in group I received an intraperitoneal (i.p.) injection of saline, and the animals in groups II, III, IV, and V received an injection of SCO (1 mg/kg) after object recognition behavioral training. Twenty-four hours after the training session, animals were subjected to an object recognition test session. After behavioral analysis, the animals were euthanized, and the brain was removed for further analysis (Fig. 1).

Behavioral parameters

Open-field test

On day 10 of the treatment, an open-field test was performed to evaluate the locomotor activity of the animals.

The open-field apparatus consisted of a box with the floor divided into 16 equal quadrants (12×12 cm). The rats were placed individually in the box, and the number of crossings that the animals made through the quadrants for 5 min was counted (Teixeira et al. 2020). The apparatus was cleaned with ethanol (40%) and dried after each animal session.

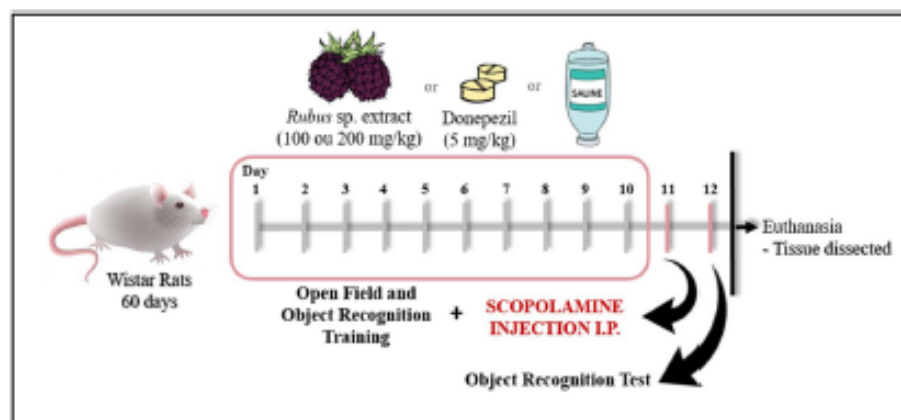
Object recognition test

The object recognition test was performed on day 11 to assess the animals' memory. This test was performed in two phases, using the same apparatus used for the open-field test. In the first phase of the training, the animals were placed individually in the box, two identical objects (objects A and B) of the same color and size were placed at the center of the arena, and they were allowed to explore for 5 min. After 24 h, the test was performed. The animals were placed again in the apparatus for 5 min, but a new object with different color and shape (object C) replaced one previous object (object B) (Pacheco et al. 2018). The time spent exploring the new and familiar objects was recorded. Exploratory activity was recorded when the animals sniffed and touched objects using their front paws. Animals exploratory preference for objects was expressed by the time spent on each object, in which the recognition index = $TC/(TA + TC)$, where TA is the time taken by the animal to explore the old object (object A) and TC is the time taken to explore the new object (object C). After the behavioral test, the animals were euthanized, and the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum were collected for biochemical analysis.

AChE activity

Brain structures were homogenized in Tris-HCl (10 mM, pH 7.4), centrifuged at 1800 rpm for 10 min at 4 °C, and supernatant was collected for the AChE assay. The AChE enzymatic assay was performed using spectrophotometric method described by Ellman et al. (1961). This method

Fig. 1 Experimental design of the scopolamine (SCO)-induced amnesia and evaluation of treatment efficacy with *Rubus* sp. and donepezil



results in the formation of the yellow anion, 5,5'-dithiobis-acid-nitrobenzoic acid, and its levels are measured by determining the absorbance at 412 nm in 30 s intervals for 2 min at 27 °C. AChE activity is expressed as $\mu\text{mol AcSCh/h/mg protein}$.

Oxidative stress parameters

The cerebral tissues (cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum) were homogenized (1/10 w/v) using 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 140 mM KCl. The homogenates were centrifuged at 3500 rpm for 10 min at 4 °C, and the supernatants were collected for further analysis.

ROS

The ROS levels were measured by the oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) to fluorescent dichlorofluorescein (DCF), and 30 min after the addition of DCFH-DA to the medium, fluorescence emission was measured at 488/525 nm, according to a previously reported method (Ali et al. 1992).

TBARS

TBARS was measured using 0.67% thiobarbituric acid and 10% trichloroacetic acid and heating at 100 °C for 30 min (Esterbauer and Cheeseaman 1990), after which the absorbance was determined at 535 nm, and the results are expressed as nmol of TBARS per mg of protein.

Nitrite Levels

Nitrite levels were quantified using the Griess reaction (Huang et al. 2009), and 50 μL of supernatant with sulfanilamide in 5% phosphoric acid and N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride was incubated for 10 min at room temperature in the dark. Nitrites were quantified by spectrophotometry at 540 nm, and the results are expressed as μM nitrite per mg of protein.

Total SH Content

Total thiol content was determined according to the method described by Aksenov and Markesbery (Aksenov and Markesbery 2001). This technique was performed by adding 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) to supernatants mixed with phosphate-buffered saline buffer containing ethylenediaminetetraacetic acid, followed by incubation for 60 min in the dark, and the results are expressed as nmol 5-thio-2-nitrobenzoic acid per mg protein.

SOD Activity

SOD activity was measured according to the method described by Misra and Fridovich (1972), involving the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation of adenosine. For this assay, the medium contained catalase (10 μM), 10 μL of sample, glycine buffer (50 mM, pH 10.2) and adrenaline (60 mM). The intermediate in this reaction is superoxide, which is scavenged by SOD and measured using a spectrophotometer adjusted to 480 nm. One unit of SOD was defined as the amount of enzyme necessary to inhibit 50% of adrenaline autooxidation. The specific activity of SOD was reported in units per mg of expressed as units/mg of protein.

CAT Activity

CAT activity was determined according to the method described by Aebi (1984). This method is based on the ability of the CAT to decompose H_2O_2 and is measured by the decrease in absorbance at 240 nm. One unit of CAT was defined as one μmol of H_2O_2 consumed per minute, and the specific activity was expressed as units/mg of protein.

Protein determination

The protein levels were measured according to the method described by Lowry et al. (1951) or Bradford (1976), using bovine serum albumin as a standard.

Statistical analysis

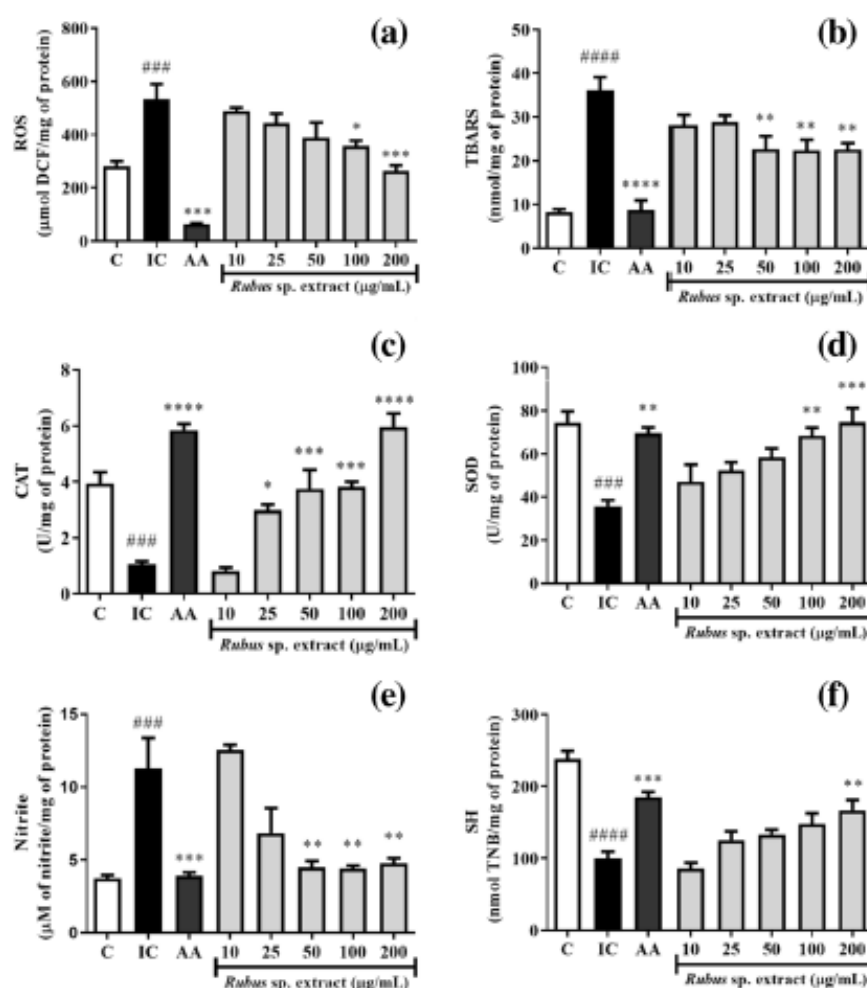
Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 software. The assumptions of normality and homogeneity were verified. Data were analyzed using one-way analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test. $P \leq 0.05$ was statistically significant. All data are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean.

Results

Rubus sp. extract exerts antioxidant effects *In Vitro*

In the brain samples exposed to H_2O_2 plus FeSO_4 , an increase in ROS, TBARS and nitrite levels was observed ($P < 0.001$); treatment with concentrations of 50, 100, and 200 $\mu\text{g/mL}$ of the *Rubus* sp prevented such changes (Fig. 2A, B, and E). In addition, treatment with H_2O_2 plus FeSO_4 induced a decrease in SH content ($P < 0.0001$); however, 200 $\mu\text{g/mL}$ of *Rubus* sp. could prevent this alteration in the brain homogenates (Fig. 1F). When brain

Fig. 2 Effects of the *Rubus* sp. extract (10, 25, 50, 100, and 200 $\mu\text{g/mL}$) and ascorbic acid (AA) on reactive oxygen species levels (a), thiobarbituric acid reactive substance levels (b), catalase activity (c), superoxide dismutase activity (d), nitrite levels (e) and total sulphydryl content (f) in the brain homogenates exposed to hydrogen peroxide (H_2O_2) and ferrous sulfate (FeSO_4). Data are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M). $^{***}P < 0.001$ and $^{****}P < 0.0001$ compared to the control group. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, and $^{****}P < 0.0005$ compared to the induced control (IC) group. ($n = 4$)



homogenates were exposed to oxidizing agents, a decrease in CAT and SOD activities was observed (Fig. 2C and D). Blackberry extract could prevent alterations in SOD activity only at high concentrations (100 and 200 $\mu\text{g/kg}$), while concentrations of 25, 50, 100, and 200 $\mu\text{g/mL}$ were effective in preventing changes in CAT activity induced by oxidant agents (Fig. 2C and D). AA, an antioxidant used as a positive control, could protect against oxidative damage induced in vitro by H_2O_2 plus FeSO_4 for all parameters analyzed (Fig. 2).

***Rubus* sp. extract prevents memory deficits induced by SCO**

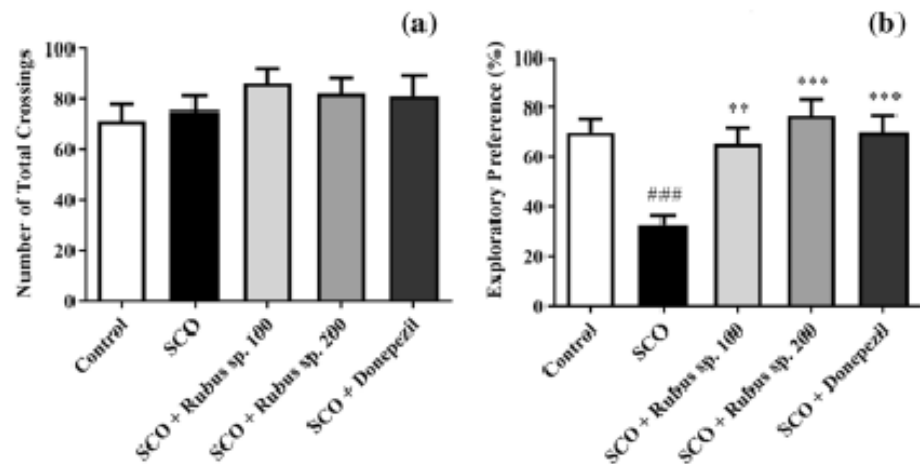
Our results showed that SCO induced memory deficits in rats by reducing the time required for exploration of the new object compared to that observed in the control group (Fig. 3B) ($P < 0.001$). *Rubus* sp. extract at both doses (100

and 200 mg/kg) could improve memory, as observed by an increase in exploration time to the new object in a behavioral test. The effects of the blackberry extract on memory were similar to those of donepezil (Fig. 3B). No changes were observed in the locomotor activity in any experimental group treated with the blackberry extract or donepezil in comparison with control group (Fig. 3A; $P > 0.05$), excluding the possibility that results of an object recognition task were associated with locomotor alterations in rats.

***Rubus* sp. extract prevents the alterations in AChE activity induced by SCO in the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum**

In animals that received SCO, an increase in AChE activity was observed in all evaluated brain structures (cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum; $P < 0.01$). Treatment for 10 days with blackberry extract (100 and 200 mg/kg)

Fig. 3 Effects of treatment with *Rubus* sp. extract (100 or 200 mg/kg) and donepezil (5 mg/kg) on the locomotor activity (open-field test) and memory (object recognition test) in a rat model with amnesia induced by SCO (1 mg/kg). Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. $^{###} P < 0.001$ compared to the control group. $^{**} P < 0.01$ and $^{***} P < 0.001$ compared to the SCO group. ($n = 10$)



and donepezil (5 mg/kg) prevented the alterations in AChE activity induced by SCO administration in rats (Fig. 4).

***Rubus* sp. extract prevents oxidative damage in the brain**

SCO induced an increase in TBARS and nitrite levels and decrease in SOD and CAT activities in the cerebral cortex ($P < 0.001$). Compared to those in the SCO group, blackberry extract (100 and 200 mg/kg) and donepezil reduced TBARS and nitrite levels (Fig. 5B, C). Blackberry extract (200 mg/kg) prevented the decrease in CAT activity induced by SCO, while donepezil prevented the alterations in both antioxidant enzymes (Fig. 5E and F). No alterations were observed in ROS and SH levels in the cerebral cortex in any of the groups evaluated (Fig. 5).

In the hippocampus, an increase in ROS, TBARS and nitrite levels, and a decrease in SH levels in animals that received SCO was noted ($P < 0.05$) (Fig. 6). Treatment with blackberry extract at both concentrations (100 and 200 mg/kg) and donepezil for 10 days prevented these alterations (Fig. 6A–D). CAT activity was reduced in the SCO group; however, 100 mg/kg *Rubus* sp. and donepezil could maintain the activity of this enzyme at levels comparable to those of the control group (Fig. 6F). No alterations were observed in the hippocampal SOD activity in any of the groups evaluated in this study (Fig. 6).

In the cerebellum, increased ROS, TBARS and nitrite levels were observed in animals that received SCO ($P < 0.05$; Fig. 7). Blackberry extract at both doses (100 and 200 mg/kg) prevented the increase in TBARS levels; however, only a high concentration of this extract could prevent alterations induced by SCO in ROS and nitrite levels in the cerebellum (Fig. 7A–C). In addition, blackberry extract (200 mg/kg) increased the SH levels in the cerebellum compared to those in animals that received only SCO ($P < 0.001$; Fig. 7D). SCO administration also decreased the CAT activity in the cerebellum, which was prevented by treatment with both doses

of blackberry extract ($P < 0.01$; Fig. 7F). Furthermore, donepezil was effective in protecting against alterations induced by SCO in ROS, TBARS, and nitrite levels and CAT activity in the cerebellum (Fig. 7). No changes were observed in the SOD activity in these brain structures in any group evaluated in this study (Fig. 7E).

Discussion

Data from literature indicate the therapeutic importance of nutritional substances. Red fruits are an important dietary source of bioactive compounds, such as vitamins and polyphenols, which help promote health and protect against diseases (Cosme et al. 2022). In this study, we showed that blackberry extract protected against memory deficits, oxidative damage, and alterations in AChE activity in different brain regions in a rat model with amnesia induced by SCO. In addition, we demonstrated the ability of blackberry extract to protect the brain against oxidative damage induced by environmental oxidants in vitro.

Blackberry (*Rubus* sp.) is a small and dark purple-colored fruit containing compounds with high antioxidant capacity (Wang and Lin 2000). Its antioxidant activity is proportional to the content phenolic compounds present, including anthocyanins (Wang and Lin 2000). The extract used in the present study was previously characterized by our research group, and the major anthocyanins found in blackberry fruits are cyanidin-*O*-galactoside, cyanidin-*O*-glucoside, cyanidin-*O*-rutinoside, cyanidin-*O*-malonylhexoside, and pelargonidin-*O*-glucoside (Chaves et al. 2020). In recent years, studies from our laboratory have demonstrated that extracts rich in anthocyanins show therapeutic potential in the treatment of brain-related diseases (Pacheco et al. 2018; Chaves et al. 2020; Soares et al. 2021).

In this study, we showed for the first time that the blackberry extract can protect against memory deficits induced by SCO. SCO, a muscarinic receptor antagonist, interferes with

Fig. 4 Effects of *Rubus* sp. extract (100 or 200 mg/kg) and donepezil (5 mg/kg) on acetylcholinesterase (AChE) activity in the cerebral cortex (a), cerebellum (b) and hippocampus (c) in a rat model with amnesia induced by SCO (1 mg/kg). Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. $^{\#} P < 0.01$ and $^{\#\#} P < 0.001$ compared to the control group. $^* P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$, and $^{***} P < 0.001$ compared to the SCO group. ($n = 6$)

the activity of the muscarinic acetylcholine receptor, resulting in transient cognitive amnesia and other neurochemical changes similar to those observed in AD (Bajo et al. 2015). Acetylcholine is an important cholinergic neurotransmitter involved in learning and memory that binds to muscarinic and nicotinic receptors. The action of acetylcholine is associated with the AChE enzyme, which is responsible for the degradation of acetylcholine into acetate and choline, thus regulating the levels of this neurotransmitter in the synaptic cleft (Sharma 2019). SCO induces memory decline via the upregulation of AChE activity in the brain, disrupting cholinergic signaling (Haider et al. 2016). Our results demonstrated that SCO induced an increase in enzyme activity in the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum, suggesting that this mechanism was responsible for the memory deficits observed in the object recognition test.

Blackberry extract could prevent alterations in AChE activity induced by SCO, suggesting that inhibition of AChE is one of the mechanisms for memory improvement. This effect on AChE activity could prevent the degradation of acetylcholine, thereby increasing the levels and action duration of this neurotransmitter (Sharma 2019). Our results corroborate with those of previous studies that showed that fruit extracts rich in anthocyanins obtained from blueberries and grapes prevent alterations in AChE activity in different experimental models (Gutierrez et al. 2014; Pacheco et al. 2018; Spohr et al. 2019).

SCO-induced cognitive decline may also be associated with changes in brain oxidative status. In this study, SCO increased the levels of oxidative damage markers and decreased the antioxidant defenses in all evaluated brain structures. Disruption of the antioxidant system can favor excessive accumulation of ROS and nitrogen species (Floyd and Hensley 2022). Overproduction of reactive species triggers a series of events that cause damage to biomolecules, thereby contributing to the loss of energy and enhanced susceptibility of neurons to apoptosis, neuroinflammatory processes, and damage to the learning process (Floyd and Hensley 2022). Several antioxidant defense mechanisms protect cellular components from oxidative damage. SOD and CAT are the major antioxidant enzyme defenses against ROS. SOD converts anionic superoxide into H_2O_2 , and CAT converts H_2O_2 into molecular oxygen and water. Our results showed that SCO did not alter SOD activity in the hippocampus and cerebellum; however, it decreased SOD activity in the cerebral cortex. In contrast, CAT activity was

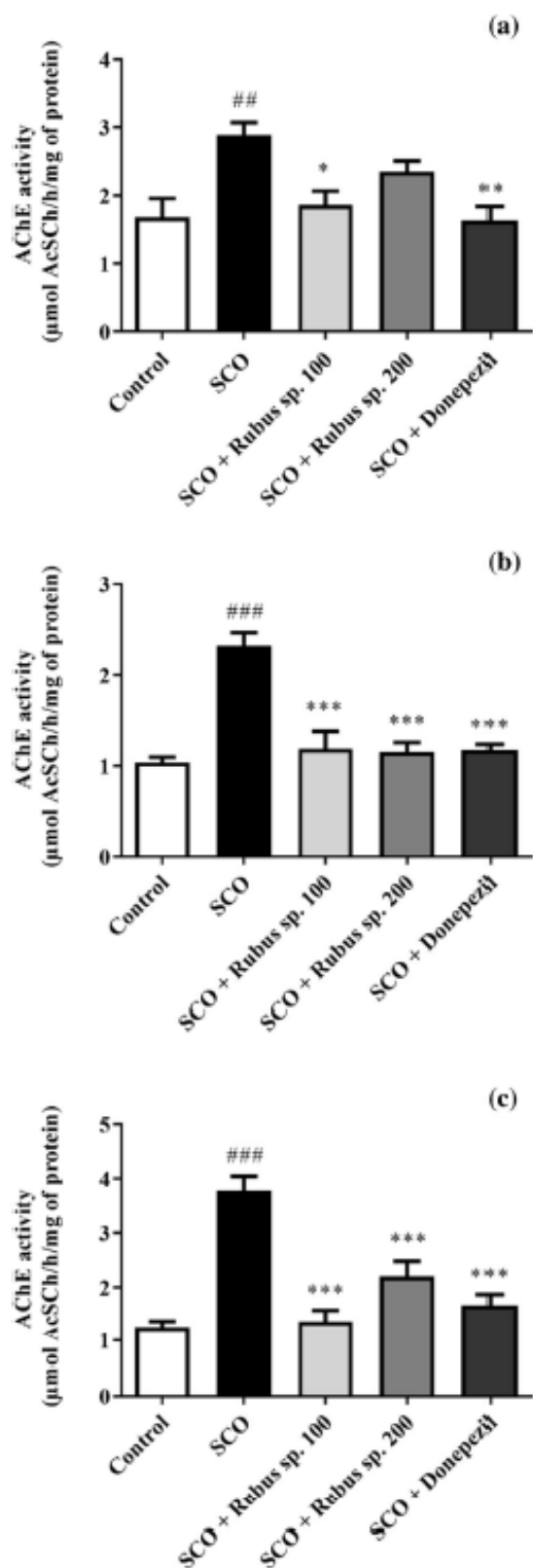
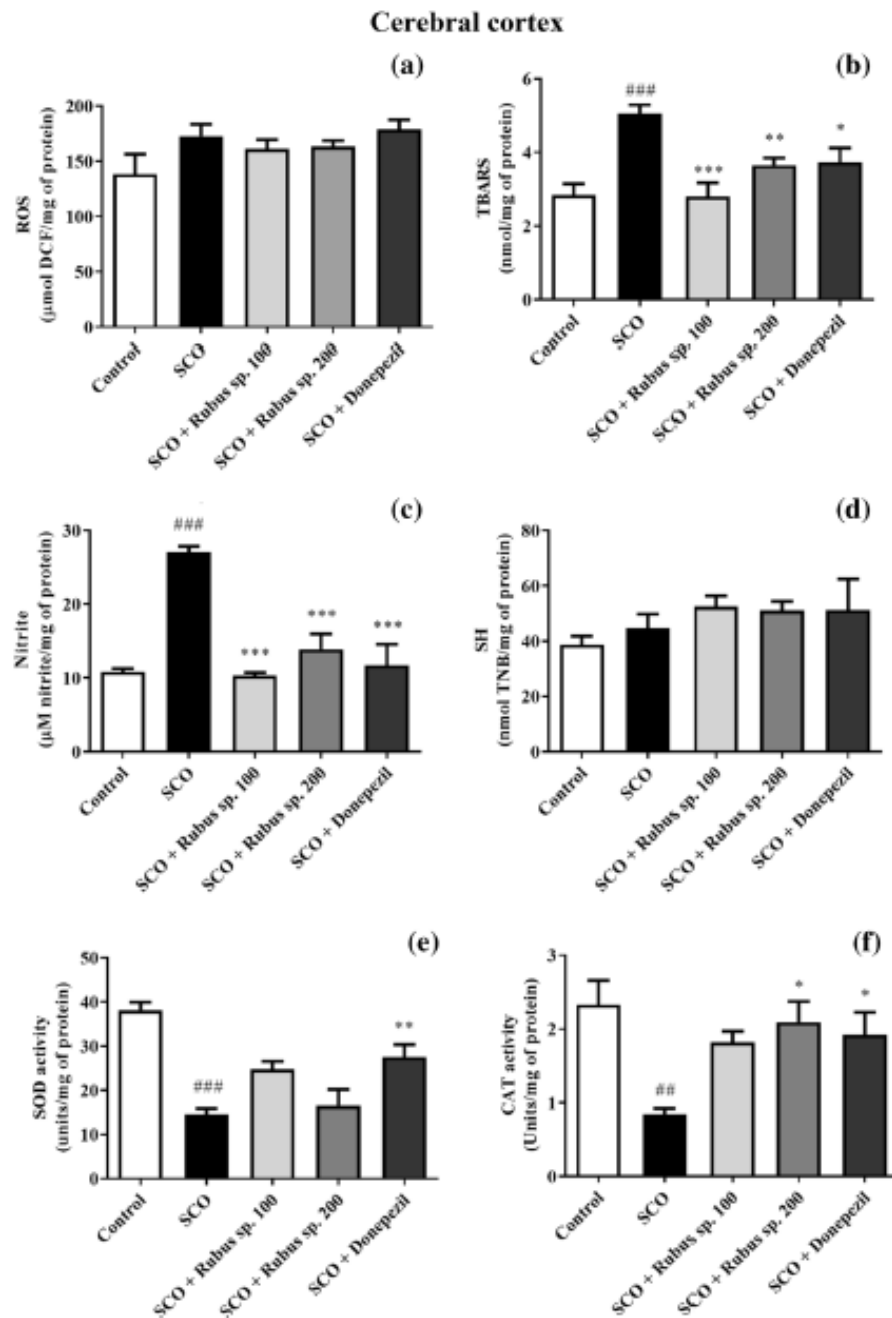


Fig. 5 Effects of treatment with *Rubus* sp. extract (100 or 200 mg/kg) and donepezil (5 mg/kg) on reactive oxygen species levels (a), thiobarbituric acid reactive substances levels (b), nitrite levels (c), total sulfhydryl content (d), superoxide dismutase activity (e) and catalase activity (f) in the cerebral cortex in a rat model with amnesia induced by SCO (1 mg/kg). Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. $^{##} P < 0.01$ and $^{###} P < 0.001$ compared to the control group. $^{*} P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$, and $^{***} P < 0.001$ compared to the SCO group. ($n = 6$)

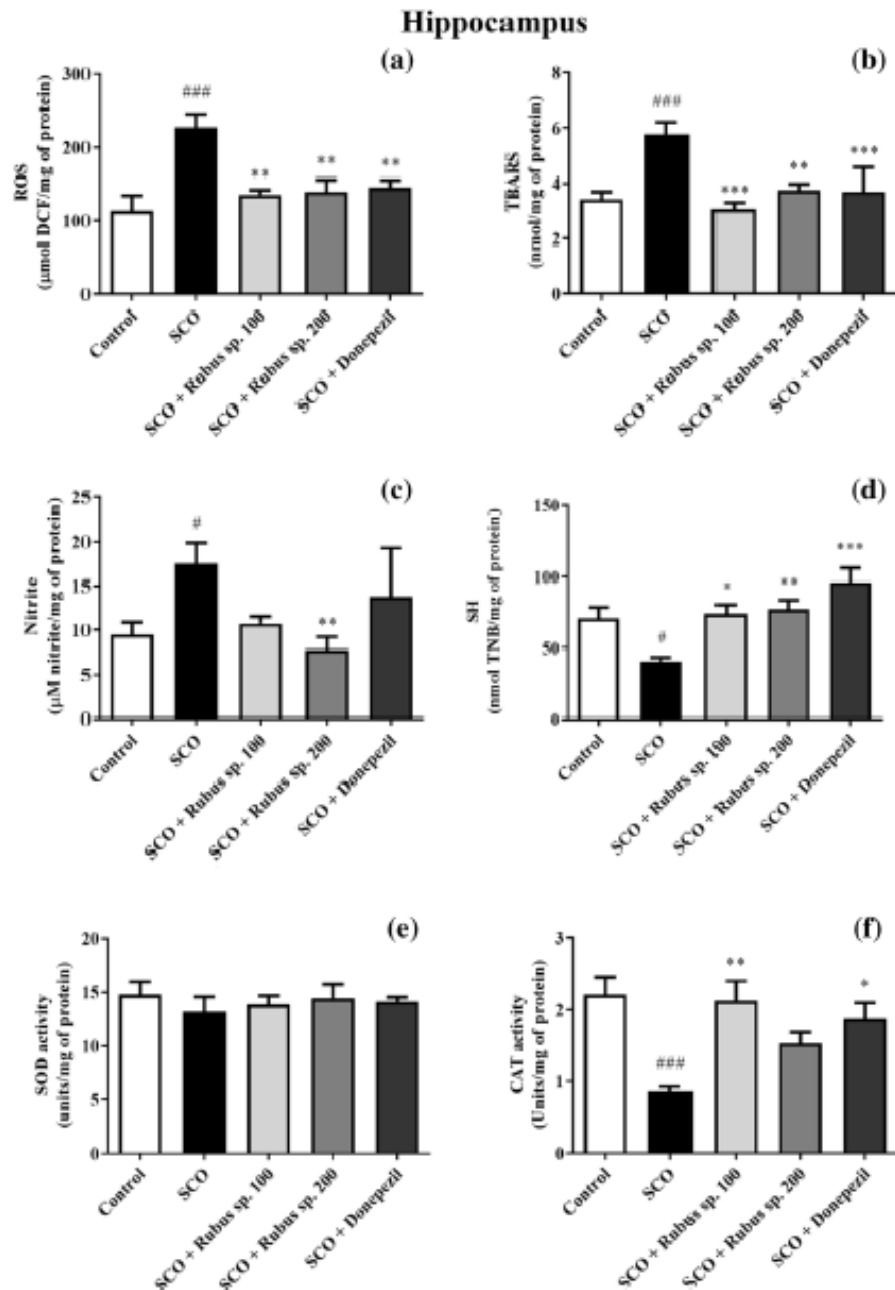


decreased in all brain structures. These results are consistent with those of another study that used SCO as an amnesia inducer (Haider et al. 2016). Alterations in antioxidant enzymes can lead to an increase in ROS levels in the brains of animals administered with SCO.

Treatment with the blackberry extract (100 and 200 mg/kg) was effective in protecting against oxidative damage induced by SCO in the brain regions. Blackberry is a fruit

of great interest because of its excellent antioxidant activity, which is attributed to the high content of anthocyanins, ellagitannins, and other phenolic compounds (Kaume et al. 2012). Anthocyanins are a major group of polyphenols, and their neuroprotective role has been attributed to their capacity to reduce intracellular reactive species levels. Anthocyanins are scavengers of free radicals and chelants of metal ions; they increase the activity of antioxidant enzymes and expression

Fig. 6 Effects of treatment with *Rubus* sp. extract (100 or 200 mg/kg) and donepezil (5 mg/kg) on oxygen reactive species levels (a), thiobarbituric acid reactive substances levels (b), nitrite levels (c), total sulfhydryl content (d), superoxide dismutase activity (e), and catalase activity (f) in the hippocampus in a rat model with amnesia induced by SCO (1 mg/kg). Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. # $P < 0.05$ and ### $P < 0.001$ compared to the control group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ compared to the SCO group. ($n = 6$)

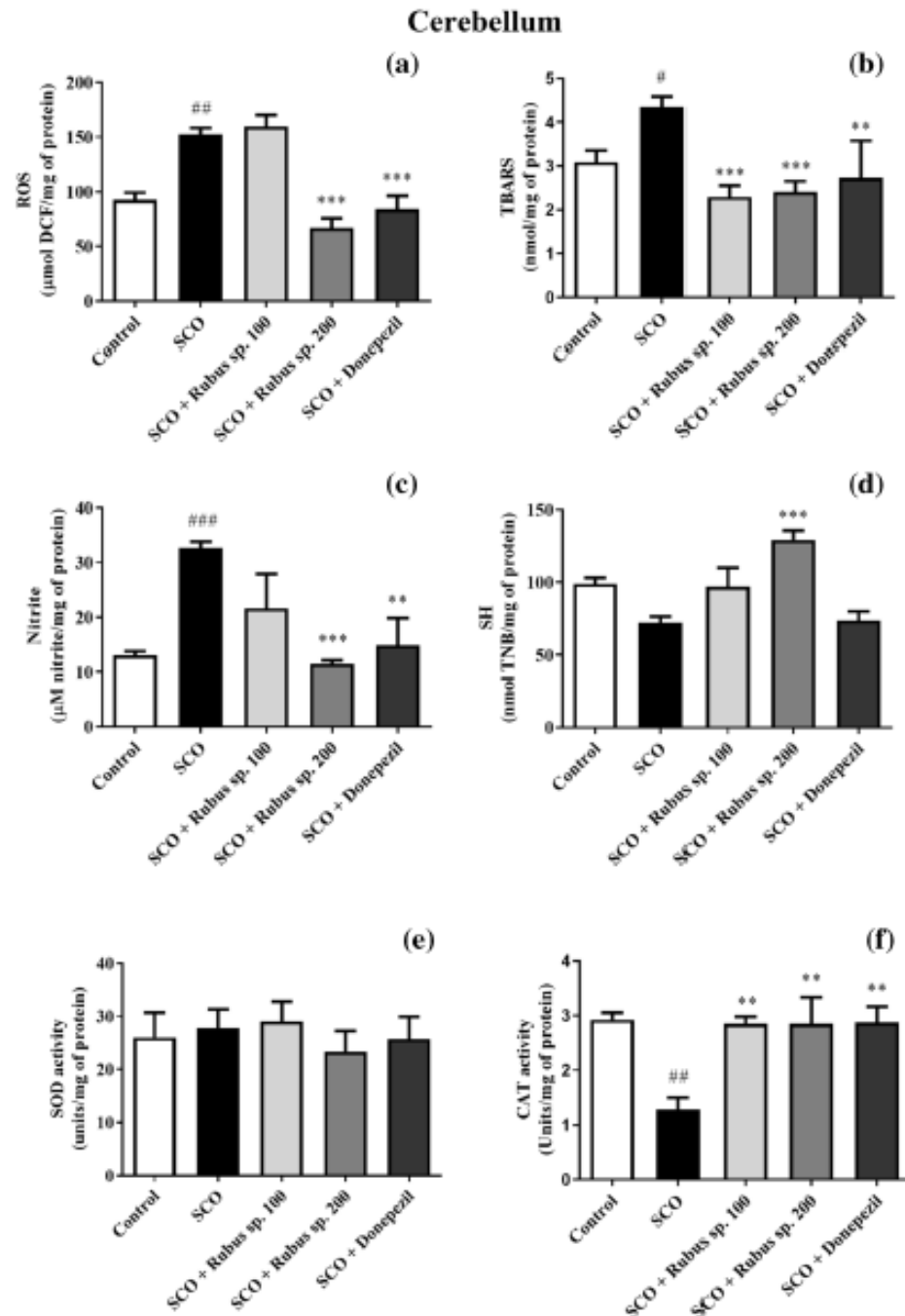


of the Nrf2-antioxidant response element (Sukprasansap et al. 2020; Pacheco et al. 2018; Kaume et al. 2012). In addition to their potent antioxidant action, anthocyanins affect calcium homeostasis, inflammation, and apoptotic signaling (Kaume et al. 2012). Although we showed that blackberry extract improves memory, possibly through its antioxidant and anticholinesterase effects, it is not possible to exclude the other biological actions of several bioactive constituents present in this fruit during memory restoration.

Although other relevant pathophysiological mechanisms have received more research attention in recent years,

treatments that improve the cholinergic function remain critical for the management of patients with AD. Therefore, we used donepezil as a positive control for our experimental model. Donepezil is an inhibitor of AChE activity that is used to treat memory dysfunction in patients with AD (Atukeren et al. 2017). We showed that this drug inhibited AChE activity in the cerebral cortex, hippocampus, and striatum of animals that received SCO. Donepezil inhibits AChE activity and suppresses brain oxidative damage in experimental models of AD (Saxena et al. 2008; Atukeren et al. 2017). These findings corroborate with our results, which also demonstrated that donepezil can

Fig. 7 Effects of treatment with *Rubus* sp. extract (100 or 200 mg/kg) and donepezil (5 mg/kg) on oxygen reactive species levels (a), thiobarbituric acid reactive substances levels (b), nitrite levels (c), total sulfhydryl content (d), superoxide dismutase activity (e), and catalase activity (f) in the cerebellum in a rat model with amnesia induced by SCO (1 mg/kg). Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. $^{\#} P < 0.05$, $^{\#\#} P < 0.01$, and $^{\#\#\#} P < 0.001$ compared to the control group. $^{**} P < 0.01$ and $^{***} P < 0.001$ compared to the control group. ($n = 6$)



protect against oxidative damage induced by SCO in all brain structures. Despite the beneficial effects of donepezil, its limited effectiveness and side effects reinforce the importance of finding more active and promising compounds to treat AD. In this study, we showed that blackberry extract exerts similar effects as donepezil, suggesting that bioactive compounds present in this fruit can contribute to the improvement in the pharmacological care of patients with AD.

In the present study, we evaluated the neurochemical changes in the cerebral cortex, hippocampus, and

cerebellum. AD affects important brain regions involved in memory, such as the cerebral cortex and hippocampus (Alle et al. 2007; Hicox et al. 2020; Rao et al. 2022). In recent years, the role of the cerebellum in AD has been discussed, and studies have suggested that the cerebellum does not contribute to the neurobiology of AD; however, is consequently affected by other pathological events that occur in distinct brain structures (Schmahmann 2016). Here, we showed changes in oxidative stress and cholinergic signaling in this brain region in a model of memory deficit. Although

more studies are necessary to understand the importance of the cerebellum in AD, our findings provide new insights into the importance of therapies focusing on the cerebellum. In addition, a limitation of this study is that only male rats were used. Data from literature have supported that sex and age is associated with differences in brain functions and with the prevalence and development of AD (Yagi and Galea 2019; Zhu et al. 2021). Thus, in future studies is important to evaluate the blackberry extract in preclinical models of AD using male and female of different age.

In conclusion, our results showed that the blackberry extract improved memory, prevented oxidative damage, and altered AChE activity in different brain regions in an experimental model of AD. Compounds capable of concurrently inhibiting AChE activity and oxidative stress could prevent the progression of neurodegenerative changes in AD. The ability of the bioactive compounds in the blackberry extract to modulate pathways involved in brain neurodegeneration, with relative safety and low toxicity, ensures its potential as a therapeutic target for further clinical studies on AD.

Acknowledgements The authors acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support. We would like to thank Editage (www.editage.com) for English language editing.

Author contributions Material preparation was performed by Julia Eisenhardt de Mello, Juliane Cardoso, Wilson Cunico, and Marcia Vizotto. Data collection and analysis was performed by Julia Eisenhardt de Mello, Karina Pereira Luduvico, Alessandra dos Santos, Fernanda Cardoso Teixeira, and Mayara Sandrielly Soares de Aguiar. Francieli Moro Stefanello and Roselia Maria Spanevello contributed to study conception, design, manuscript preparation and financial support. The first draft of the manuscript was written by Julia Eisenhardt de Mello and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

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

Data availability The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

Declarations

Competing interests The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Ethics approval All animal experiments were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Pelotas (protocol number: 027350/2021-12).

Consent to participate Not applicable.

Consent to publish Not applicable.

References

- Aebi H (1984) Catalase in Vitro Meth Enzymol 105:121–126
- Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Letters* 302:141–145
- Ali SF, Lebel CP, Bondy SC (1992) Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicol* 13:637–648
- Alle G, Barnad H, McColl R, Hester A, Fields J, Weiner M, Ringe W, Lipton A, Brooker M, McDonald E, Rubin C, Cullum M (2007) Reduced hippocampal functional connectivity in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 64:1482–1487. <https://doi.org/10.1001/archneur.64.10.1482>
- Antunes L, Peres N (2013) Strawberry Production in Brazil and South America. *Int J Fruit Sci* 13:156–161
- Atukeren P, Cengiz M, Yavuzer H, Gelizgen R, Altunoglu E, Oner S, Erdenen F, Yuceakin D, Derici H, Cakatay U, Uzun H (2017) The efficacy of donepezil administration on acetylcholinesterase activity and altered redox homeostasis in Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother* 90:786–795. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.03.101>
- Bajo R, Pusil S, López M, Canuet L, Pereda E, Osipova D, Maestú F, Pekkenen (2015) Scopolamine effects on functional brain connectivity: a pharmacological model of Alzheimer Disease. *Sci Rep* 5:9748. <https://doi.org/10.1038/srep09748>
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Chaves V, Soares MS, Spohr L, Teixeira L, Vieira A, Constantino L, Dal Pizzol F, Lencina C, Spanevello RM, Freitas M, Simões CM, Reginaldo F, Stefanello F (2020) Blackberry extract improves behavioral and neurochemical dysfunctions in a ketamine induced rats model of mania. *Neurosci Lett* 714:134566. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134566>
- Chen Y (2018) Research Progress in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Chin Med J* 131:1618–1624
- Chu LW (2012) Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. *Hong Kong Med J* 18:228–237
- Cosme F, Pinto T, Morais C, Bacelar E, Anjos R, Ferreira-Cardoso J, Oliveira I, Viela A, Gonçalves B (2022) Red fruits composition and their health benefits – a review. *Foods* 11:644. <https://doi.org/10.3390/foods11050644>
- Daubeny H (1996) Brambles. *Fruit Breeding* 2:109–190
- Ellman G, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88–95
- Esterbauer H, Cheeseman K (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186:407–421
- Fernandez AM, Torres-Aleman I (2012) The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci* 13:225–239
- Floyd R, Hensley K (2022) Oxidative stress in brain aging: implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 23:795–807. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00019-2](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00019-2)
- Folmer F, Basavaraju U, Jaspars M (2014) Anticancer effects of bioactive berry compounds. *Phytochem Reviews* 13:295–322
- Golovinskaia O, Wang C (2021) Review of functional and pharmacological activities of berries. *Molecules* 26:3904. <https://doi.org/10.3390/molecules26133904>

- Gutierrez J, Carvalho F, Schetinger M, Agostinho P, Marisco P, Vieira J, Rosa M, Bohnert C, Rubin M, Morsch V, Spanevello R, Mazzanti C (2014) Neuroprotective effect of anthocyanins on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine induced amnesia in rats. *Int J Dev Neurosci* 33:88–97. <https://doi.org/10.1016/j.jdevneu.2013.12.006>
- Haider S, Tabassum S, Perveen T (2016) Scopolamine-induced greater alterations in neurochemical profile and increased oxidative stress demonstrated a better model of dementia: a comparative study. *Brain Res Bull* 127:234–247. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.10.002>
- Hampel H, Mesulam M, Cuello A, Farlow M, Giacobini E, Grossberg GT, Khachaturian A, Vergallo A, Cavado E, Snyder P, Khachaturian Z (2018) The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* 141:1917–1933. <https://doi.org/10.1093/brain/awy132>
- Hicox H, Johnson C, McGarry M, Marshall H, Ritchie C, Beek E, Roberts N, Starr J (2020) Mechanical property alterations across the cerebral cortex due to Alzheimer's disease. *Brain Commun* 2:fcb049. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcb049>
- Huang WC, Lin YS, Wang CY, Tsai CC, Tseng HC, Chen CL, Lu PJ, Chen PS, Qian L, Hong J, Lin C (2009) Glycogen synthase kinase-3 negatively regulates anti-inflammatory interleukin-10 for lipopolysaccharide-induced iNOS/NO biosynthesis and RANTES production in microglial cells. *Immunology* 128:275–286
- Kasá P, Rakonczay Z, Gulya K (1997) The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Progress Neurobiol* 52:511–535. [https://doi.org/10.1016/S0304-0082\(97\)00028-2](https://doi.org/10.1016/S0304-0082(97)00028-2)
- Kaume L, Howard L, Devareddy L (2012) The blackberry fruit: a review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. *J Agric Food Chem* 60:5716–5727. <https://doi.org/10.1021/jf203318p>
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- McGleenon B, Dyan K, Passmore A (1999) Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Br J Clin Pharmacol* 48:471–480. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1999.00026.x>
- Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170–3175
- Pacheco SM, Soares MSP, Gutierrez JM, Gerzson MF, Carvalho FB, Azambuja JH, Schetinger MRC, Stefanello FM, Spanevello RM (2018) Anthocyanins as a potential pharmacological agent to manage memory deficit, oxidative stress and alterations in ion pump activity induced by experimental sporadic dementia of Alzheimer's type. *J Nutr Biochem* 56:193–204. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.02.014>
- Rao YL, Ganaraja B, Murlimanju BV, Joy T, Krishnamurthy A, Agrawal A (2022) Hippocampus and its involvement in Alzheimer's disease: a review. *3 Biotech* 12:55. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03123-4>
- Saxena G, Singh S, Agrawal R, Nath C (2008) Effect of donepezil and tacrine on oxidative stress in intracerebral streptozotocin-induced model of dementia in mice. *Eur J Pharmacol* 581:283–289. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.12.009>
- Scheltens P, Strooper B, Kibipello M, Chételat G, Teunissen C, Cummings J, Flier W (2021) Alzheimer's Disease. *Lancet* 397:1577–1590. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4)
- Schmahmann J (2016) Cerebellum in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia: not a silent bystander. *Brain* 139:1314–1318. <https://doi.org/10.1093/brain/aww064>
- Sharma K (2019) Cholinesterase Inhibitors as Alzheimer's therapeutics (review). *Mol Med Rep* 20:1479–1487. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10374>
- Shukitt-Hale B, Cheng V, Joseph J (2009) Effects of blackberries on motor and cognitive function in aged rats. *Nutr Neurosci* 12:135–140. <https://doi.org/10.1179/147683009X423292>
- Soares MSP, Luduvico K, Chaves V, Sophr L, Meine B, Lencina CL, Reginatto F, Spanevello RM, Simões CMO, Stefanello FM (2021) The protective action of Rubus sp. fruit extract against oxidative damage in mice exposed to lipopolysaccharide. *Neurochem Res* 46:1129–1140. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03248-7>
- Spohr L, Soares MSP, Oliveira PS, da Silveira de Mattos B, Bona NP, Pedra NS, Teixeira FC, do Couto CAT, Chaves VC, Reginatto FH, Lisboa MT, Ribeiro AS, Lencina CL, Stefanello FM, Spanevello RM (2019) Combined actions of blueberry extract and lithium on neurochemical changes observed in an experimental model of mania: exploiting possible synergistic effects. *Metab Brain Dis* 34:605–619. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2019.01.011>
- Sukprasansap M, Charvorachole P, Tencomao (2020) Cyanidin-3-glucoside activates Nrf2-antioxidant response element and protects against glutamate-induced oxidative and endoplasmic reticulum stress in HT22 hippocampal neuronal cells. *BMC Complement. Med Ther* 20:46. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-2819-7>
- Tatar M, Bagheri Z, Varedi M, Naghibalhossaini F (2019) Blackberry extract inhibits telomerase activity in human colorectal cancer cells. *Nutr Cancer* 71:461–471. <https://doi.org/10.1080/01635581.2018.1506491>
- Tavares L, Figueira I, Macedo D, McDougall G, Leitão M, Vieira H, Stewart D, Alves P, Ferreira RB, Santos CN (2012) Neuroprotective effect of blackberry (Rubus sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chem* 131:1443–1452
- Teixeira FC, Gutierrez JM, Soares MSP, Mattos B, Spohr L, Couto CAT, Bona N, Assmann C, Morsch VM, Cruz IBM, Stefanello FM, Spanevello RM (2020) Inosine protects against impairment of memory induced by experimental model of Alzheimer disease: a nucleoside with multitarget brain actions. *Psychopharmacol* 237:811–823. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05419-5>
- Velde FV, Esposito D, Grace M, Pirovani M, Lila M (2019) Anti-inflammatory and wound healing properties of polyphenolic extract from strawberry and blackberry fruits. *Food Res Int* 121:453–462. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.059>
- Wang S, Lin H (2000) Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J Agric Food Chem* 48:140–146. <https://doi.org/10.1021/jf9908345>
- Xie P, Zhang Y, Wang X, Wei X, Kang W (2017) Antithrombotic effect and mechanism of Rubus spp. *Blackberry Food Funct* 24:2000–2012. <https://doi.org/10.1039/c6fo01717g>
- Yagi S, Galea L (2019) Sex differences in hippocampal cognition and neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* 44:200–213. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0208-4>
- Zhu X, Su B, Wang X, Smith M, Perry G (2007) Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci* 64:2002–2210
- Zhu D, Montagne A, Zhao Z (2021) Alzheimer's pathogenic mechanisms and underlying sex difference. *Cell Mol Life Sci* 78:4907–4920. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03830-w>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

4.2 Capítulo 2

Treatment with blackberry extract and metformin in a model of sporadic Alzheimer's disease: impact in memory, inflammation, redox status, phosphorylated tau protein and insulin signaling

Julia Eisenhardt de Mello, Fernanda Cardoso Teixeira, Karina Luduvico, Mayara Sandrielly Soares de Aguiar, William Borges Domingues, Vinicius Farias de Campos, Rejane Tavares, Augusto Schneider, Francieli Stefanello, Roselia Spanevello

Status: Submetido no periódico *Journal of Nutritional Biochemistry*

Treatment with blackberry extract and metformin in sporadic Alzheimer's disease model: impact on memory, inflammation, redox status, phosphorylated tau protein and insulin signaling

Julia Eisenhardt de Mello^a, Fernanda Cardoso Teixeira^b, Alexandra dos Santos^a, Karina Luduvico^a, Mayara Sandrielly Soares de Aguiar^a, William Borges Domingues^c, Vinicius Farias de Campos^{a,c}, Rejane Tavares^e, Augusto Schneider^{a,d}, Francieli Stefanello^a, Roselia Spanevello^a

^a Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário Capão do Leão s/n, Pelotas-RS, CEP 96010-900, Brazil.

^b Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre-RS, CEP 90050-170, Brazil.

^c Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário Capão do Leão, s/n, Pelotas-RS, CEP 96010-900, Brazil.

^d Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Porto, Rua Gomes Carneiro 1, Pelotas-RS, CEP 96010-610, Brazil.

^e Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário Capão do Leão s/n, Pelotas-RS, CEP 96010-900, Brazil.

Corresponding author:

Roselia Maria Spanevello

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos/Bioquímica, Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Prédio 29, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, s/n, CEP 9601090, Caixa Postal 354, Pelotas, RS, Brazil

Phone: +55 53 32757355

Email: rspanevello@gmail.com or roselia.spanevello@ufpel.edu.br

Abstract

Natural products offer promising potential for the development of new therapies for Alzheimer's disease (AD). Blackberry fruits are a rich source of phytochemical compounds capable to modulating pathways involved in neuroprotection. Additionally, drug repurposing and repositioning could also accelerate the development of new treatments for AD. In light of the reduced brain glucose metabolism in AD, an alternative approach has been the use of the drug metformin. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of treatment with blueberry extract in a model of AD induced by streptozotocin (STZ) and compare it with metformin treatment. Male rats were divided into groups: I - Control; II - STZ; III - STZ + blackberry extract (100 mg/kg); IV - STZ + blackberry extract (200 mg/kg) and V - STZ + metformin (150 mg/kg). The animals received intracerebroventricular injections of STZ or buffer. Seven days after the surgical procedure, the animals were treated orally with blackberry extract or metformin for 21 days. Both blackberry extract and metformin prevented the memory impairment induced by STZ. In animals of group II, an increase in acetylcholinesterase activity, phosphorylated tau protein, IL-6, oxidative damage, and gene expression of GSK3 β and Nrf2 was observed in hippocampus. STZ also induced a decrease in IL-10 levels and down-regulation the gene expression of Akt1, IRS-1 and FOXO3a. Blackberry extract and metformin prevented the alterations in acetylcholinesterase activity, IL-6, GSK3 β , Nrf2, and oxidative damage. In conclusion, blackberry extract and metformin exhibit multi-target actions in a model of AD, suggesting new therapeutic potentials for this neurodegenerative disease.

Keywords: Blackberry, Streptozotocin, Hippocampus, Memory, Metformin, Rat

1. Introduction

Alzheimer disease (AD) is a neurodegenerative and irreversible condition, representing the common cause of dementia with significant morbidity and mortality in adults older than 65 years [1]. AD is characterized by a progressive decline in memory and other cognitive ability, inevitably resulting in the loss of independence, with great impact on economy and health care system. The development and progression of AD has been associated with multifactorial interactions, including genetic, environmental and lifestyle factors [2,3].

Over the last few decades, significant advancements have been made in understanding the molecular and biochemical mechanisms underlying the pathogenesis of AD. Memory decline and neurodegeneration in AD has been associated with the production and deposition of the β -amyloid peptides [4], the aggregation of abnormally hyperphosphorylated tau protein [4], oxidative damage to brain molecules [5], synaptic dysfunction including the cholinergic signaling; and neuroinflammation mediated by astrocytes and microglia activation [6]. Additionally, reduced brain glucose metabolism and insulin resistance also play a crucial role in the development and progression of AD [7]. Based on these findings, numerous therapeutic strategies have been investigated; however, unfortunately, the current therapeutic arsenal is limited, with no curative treatment available for AD.

The current pharmacological approach to AD treatment is mainly acetylcholinesterase inhibitors or memantine [8]. In recent years, aducanumab, an amyloid-targeting monoclonal antibody has been approved for the management of patients with AD [9]. However, due to the limited therapeutic options available, research on drug repositioning has been conducted with the aim of finding new treatments for this neurodegenerative disease. Considering that AD shares pathophysiological similarities with diabetes mellitus, particularly regarding glucose metabolism, an alternative therapy for AD has been the use of metformin, a biguanide hypoglycemic agent [10]. In fact, studies have shown that metformin has a protective effect against cognitive decline in individuals with type 2 diabetes and reduces the risk of developing AD in diabetic patients [11,12]. Additionally, animal studies have demonstrated that metformin can reduce the accumulation of β -amyloid plaques in the brain, a hallmark of AD [13]. However,

the results are controversial and further studies are necessary to understand the potential benefits and risks of metformin for AD treatment [14,15,16].

Natural products also present a promising source of new therapies for AD. Blackberry fruits are abundant in phytochemical compounds, such as anthocyanins, which have the ability to modulate pathways involved in neuroprotection [17,18]. In fact, previous studies from our research group demonstrated that blackberry extract (*Rubus* sp.) improves memory, reduces inflammation, and mitigates oxidative damage in experimental models of mania [19], neuroinflammation [20], and amnesia [21]. However, studies evaluating the effects of this fruit on mechanisms associated with AD are still limited in the literature.

The streptozotocin (STZ) - induced AD model in rodents is a useful tool to investigating pathological mechanisms and new therapeutic approaches for this neurodegenerative disease. STZ desensitizes brain insulin receptors leading to impaired glucose metabolism [22]. The brain alterations induced by this model are similar to those observed in AD, including neuroinflammation, tau protein accumulation and deficits in learning and memory [23]. Therefore, the objective of this study was to evaluate the potential of *Rubus* sp. extract in improving memory, reducing inflammation and modulating the redox status, phosphorylated tau protein, and insulin signaling in the hippocampus of rats submitted to experimental model of DA induced by STZ. Additionally, considering that STZ is associated with a disruption in cerebral glucose metabolism, we also evaluated the therapeutic potential of metformin drug as a positive control.

2. Materials and Methods

2.1 Animals and Ethical Procedures

The animals procedures were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Pelotas (protocol number: 42067-2019) in accordance with the National Institutes of Health Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals. Male Wistar rats (60-days-old, 300–350 g) were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Pelotas (Pelotas, RS, Brazil). The rats were kept at a constant temperature (22 ± 1 °C) under a light/dark cycle with free access to water and food.

2.2 Methanolic Blackberry Extract

To prepare the extract, frozen blackberry fruits were sliced and 1 g of fruit was weighed. Next, 60 mL of methanol was added, and sequentially placed in an ultrasound bath for 60 minutes. After sonication, the extract was filtered and placed in a freezer for 24 h. Subsequently, the solvent was completely evaporated using rotary evaporation to obtain the crude extract. The crude extract was lyophilized, stored away from light, and kept in a freezer at -80°C until further use. *The Rubus sp.* fruits (Tupy cultivar) used in this study was cultivated and provided by Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (EMBRAPA) in Pelotas, RS, Brazil ($31^{\circ}40'50.6''\text{S}$, $52^{\circ}26'23.1''\text{W}$).

The phytochemical composition of the *Rubus sp.* fruit extract has been previously determined by our research group [19]. Anthocyanins were evaluated using high-performance liquid chromatography coupled to a photodiode array detector and a high-resolution mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source. The major anthocyanins identified were cyanidin-O-galactoside and cyanidin-O-rutinoside [19].

2.3 Intracerebroventricular (icv) injection of streptozotocin (STZ)

The animals were anesthetized with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). After anesthesia, the head was positioned in the stereotaxic apparatus, and an incision was made in the scalp. Following the coordinates described by Herman and Watson (1987), the stereotaxic was carefully adjusted to an anteroposterior position -0.8 mm, lateral 1.5 mm, and dorsoventral -4.0 mm in relation to the bregma. The tooth bar was set to 0 mm to position the needle ventral the dura mater.

Thus, a hole was made in the skull of the animals using a drill, and a 28-gauge Hamilton® syringe needle coupled to the stereotaxic apparatus, was inserted into each of the ventricles with a volume of $5\mu\text{l}$ of STZ or buffer solution. STZ was dissolved in citrate buffer (pH 4.5). After completing this procedure, the skin together with the subcutaneous tissue were sutured with 4.0 nylon needle thread, and the area was treated with 2% iodine solution for antisepsis. After stereotaxic surgery, the animals received a painkiller (paracetamol solution 200 mg/mL) during three consecutive days.

2.4 Treatment with blackberry extract and metformin

Fifty rats were divided into five experimental groups (n = 10): I - Control (saline); II - STZ; III - STZ + *Rubus* sp. (100 mg/kg); IV - STZ + *Rubus* sp. (200 mg/kg) and V - STZ + Metformin (150 mg/kg). On 8th day after ICV-STZ, rats of the groups III and IV were treated with blackberry extract, while rats of the group V was treated with metformin. The blackberry extract and metformin was dissolved in distilled water and administrated orally to the animals during 21 days. The doses of blackberry extract and metformin were based on previous studies the literature [15,19,21]. On the 27th, 28th, 29th days after STZ injection, the animals were submitted to behavioral tests including open field, object recognition and Y maze. After the behavioral tests, the animals were anesthetized, euthanized and hippocampus and blood were collected for further analysis (see experimental scheme in Figure 1)

2.5 Behavioral Parameters

2.5.1 Open Field Test

The open field test was performed on the 27th day of treatment to evaluate the locomotor activity of the animals. Each rat was placed individually in a box with the floor divided into 16 equal quadrants measuring 12 cm × 12 cm. The number of crossings made by the animals across the quadrants was counted over a time of 5 minutes [24].

2.5.2 Object Recognition Test

The object recognition test was conducted in two phases using the same apparatus used for the open-field test. On the 27th day, the first phase of the training test was carried out. The animals were placed individually in the box with two identical objects (objects A and B) of the same color and size. The animals were allowed to explore the objects for 5 minutes. After 24 hours, on the day 28th, the test phase was conducted. The animals were placed again in the apparatus for 5 minutes, but one of the previous objects (Object B) was replaced by a new object of the different color and shape (object C) [18]. The animals' exploratory preference for objects was determined based on the spent on each object. The recognition index was calculated using the formula: $TC/(TA + TC)$, where TA

represent the spent exploring the old (object A) and TC represent the time spent exploring the new object (object C). Exploratory activity was recorded when the animals sniffed and touched the object with their forepaws, and the duration of exploration was recorded.

2.5.3 Y-maze Test

On the 29th day after STZ, rats performed the Y-maze test to assess learning, memory, and spatial recognition using three-armed apparatus: the start arm, where the animals were initially placed to begin their exploration (always open); the novel arm, which was blocked during the training session, but opened during the test session; and another arm (always open).

During the training session, the rat was placed in the apparatus on the start arm and allowed to freely explore only the start arm and the other arm for five minutes. The novel arm was blocked during the training session. After three hours, the test session was conducted with the novel arm open, and the rat could freely explore all three arms over a five-minute period. After each session, the apparatus was cleaned using 40% ethanol. Experimenters, who were blinded to the experiment, manually recorded the time spent in each arm. The results were expressed as the number of entries and time spent in each arm [24].

2.6 AChE Activity

The hippocampus was homogenized in a glass potter with 10 mM Tris-HCl solution (pH 7.4) and centrifuged at 1800 rpm for 10 min at 4°C. The resulting supernatant was collected and used for AChE assays. The protein content was determined using the coomassie blue method, with bovine serum albumin as the standard. AChE enzymatic assay was performed as previously described by Ellman et al. [25]. The reaction system consisted of 10 mM DTNB, 100 mM phosphate buffer (pH 7.5), and the enzyme (40–50 µg of protein), was pre-incubated for 2 minutes. The reaction was initiated by adding 0.8 mM AcSCh, and the absorbance was measured at 412 nm using a spectrophotometer at 30 seconds intervals for 2 min at 27°C. All samples were tested in duplicate and enzyme activity was expressed in µmol AcSCh/h/mg of protein.

2.7 Phosphorylated tau protein levels

The level of phosphorylated tau protein in the hippocampus was determined using an ELISA Kit with specific monoclonal antibodies for rat pMAPT/pTAU (Elabscience catalog No: E-EL-R1090, USA). The measurements were conducted following the manufacturer's protocols, and the results were expressed in pg/mL.

2.8 Determination of IL-6 and IL-10 levels in hippocampus

The levels of IL-6 was measured using Rat IL-6 ELISA Kit (Millipore, Product Number RAB0311, USA) and the levels of IL-10 was measured using IL-10 ELISA Kit (Millipore, Product Number RAB0246, USA). The assays were according to the manufacturer's instructions, and results were expressed as pg/mg de protein.

2.9 RNA extraction, cDNA synthesis and quantitative real-time polymerase chain reaction

mRNA expression of glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β), nuclear factor erythroid 2- related factor 2 (Nrf2), AKT1, insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and Forkhead box O3a (FOXO3a) were analysed in the hippocampus. Total mRNA was extracted from 50 – 100 mg of hippocampus tissue (n = 6 for each experimental group) using TRIzol reagent (Invitrogen™, Carlsbad, USA) followed by DNase treatment with DNase I Amplification Grade (Invitrogen™, Carlsbad, USA) in order to ensure minimum DNA contamination of the samples. The total RNA isolated was quantified and its purity (260/280 and 260/230 ratios) was examined by spectrophotometer NanoVue (GE, Fairfield, CT, USA).

The cDNA synthesis was performed using High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (AppliedBiosystems™, UK) according to the manufacturer's protocol. For reverse transcription, 1 μ g of total RNA was used in a reaction volume of 20 μ l. The amplification was made with GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI) using the LightCycler® 96 System (Roche Diagnostics, USA) and the sequence of primers used are indicated in Table 1. The qPCR conditions were as follows: 10 min at 95°C to activate the hot-start Taq polymerase, followed by 35 cycles of denaturation for 15 s at 95°C, primer

annealing for 60 s at 60°C, and extension for 30 s at 72°C (fluorescence signals were detected at the end of every cycle). Baseline and threshold values were automatically set by the LightCycler® 96 System software. The number of PCR cycles required to reach the fluorescence threshold in each sample was defined as the Ct value, and each sample was analyzed in duplicate to obtain an average Ct for each sample. The $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method was used to normalize the fold change in gene expressions by Livak and Schmittgen, 2001, using β -actin as housekeeping gene.

2.10 Oxidative Stress Parameters

The hippocampus were homogenized in sodium phosphate buffer (pH 7.4). Homogenates were centrifuged at 3500 rpm for 10 minutes at 4°C. The pellet was discarded, and the supernatant was used for further measurements. All samples were stored at -80°C until use.

2.10.1 Reactive oxygen species (ROS) assay

ROS formation was determined as previously described by Ali et al. [26]. The oxidation of DCFH-DA to DCF (2',7'-dichlorofluorescein), a fluorescent compound, was used to measure intracellular reactive species. Briefly, 5 μ L of the hippocampal homogenate, 190 μ L of Tris-HCl buffer, and 10 μ L of 1 mM DCF were incubated in the dark at 37°C. Posteriorly, the fluorescence intensity emission of DCF was recorded at 525 and 488 nm excitation 30 min after addition of DCFH-DA to the medium. The results are reported as μ mol DCF per mg of protein.

2.10.2 Thiobarbituric acid reactive substance assay

The levels of thiobarbituric acid reactive substance were determined as described by Esterbauer and Cheeseman [27]. The samples were mixed with trichloroacetic acid (15%) and centrifuged. The supernatant was mixed with thiobarbituric acid (0.67%) and incubated in a dry block at 100°C for 30 min. The levels of thiobarbituric acid reactive substance were determined by measuring the absorbance at 535 nm and reported as nmol of thiobarbituric acid reactive substances per mg of protein.

2.10.3 Nitrite levels

The nitrite content was determined using the Griess reaction, following the method described by Huang et al. [28]. Briefly, 50 μ L of the sample was mixed with 50 μ L of sulphanilamide in 5% phosphoric acid were incubated for 10 min at room temperature. Next, 50 μ L of N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (0.1 %) was added, and the mixture was incubated for 10 min at room temperature. The absorbance at 540 nm was measured. A sodium nitrite solution was used as the reference standard, and the results are expressed as μ mol NO_2^- per mg of protein.

2.10.4 Total sulfhydryl content assay

The total sulfhydryl content was determined following the method described by Aksenov and Markesbery [29]. Briefly, 10 μ L of the sample was mixed with 145 μ L of PBS–EDTA (1 mM), pH 7.5. For the reaction, 10 μ L of DTNB (10 mM) in PBS was added to the mixture. After 1 hour of incubation at room temperature in the dark, the absorbance was measured spectrophotometrically at 412 nm, and the results were expressed as nmol TNB per mg the protein.

2.10.5 Superoxide dismutase (SOD) activity

The SOD activity was measured using the method described by Misra and Fridovich [30]. This assay is based on the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation of adrenochrome. For this assay, the medium contained catalase (10 μ M), 10 μ L of sample, glycine buffer (50 mM, pH 10.2) and adrenaline (60 mM). The intermediate in this reaction is superoxide, which is scavenged by SOD and measured using a spectrophotometer adjusted to 480 nm. One unit of SOD was defined as the amount of enzyme necessary to inhibit 50% of adrenaline autooxidation. The specific activity of SOD was reported in units per mg of protein.

2.10.6 Catalase (CAT) activity

The CAT activity was evaluated as described by Aebi [31]. For this analysis, 10 μ L of the sample was mixed with Triton X-100 (1:10 w/v) and potassium phosphate buffer (pH 7.0). The reaction was initiated by addition 30 mM of hydrogen peroxide (H_2O_2) in 50 mM potassium phosphate buffer (pH

7.0). This method is based on the ability of the CAT to decompose H_2O_2 and is measured by the decrease in absorbance at 240 nm. One unit of CAT was defined as one μmol of H_2O_2 consumed per minute, and the specific activity was expressed as units per mg of protein.

2.10.7 Gultathione S-Transferase (GST) assay

The activity of GST enzyme was evaluated using 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) conjugation with thiol group of glutathione (GSH) in reaction medium containing 10 mM of GSH and 20 mM of potassium phosphate buffer (pH 6.5). The enzyme activity was quantified by measuring the absorbance at 340 nm, and the result expressed as μmol GS-DNB/min per mg the protein.

2.11 Levels of insulin in cerebrospinal fluid and glucose and insulin levels in serum

Insulin levels was determined in serum and cerebrospinal fluid using Rat Insulin ELISA Kit (Millipore, Product Number RAB0904, USA). The kit was performed according to the manufacturer's protocols and the quantification was done at an absorbance of 450 nm. The results were expressed in (pg/mL). Glucose levels were determined in serum using a commercial kit (Bioclin catalog No. K082-2, MG - Brazil), according with the manufacturer's instructions.

2.12 Protein Determination

Protein levels were measured using the method described by Lowry et al. [32] or Bradford [33], with bovine serum albumin used as a standard.

2.13 Statistical Analysis

Data were analyzed using one-way analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test. $P \leq 0.05$ was considered to be statistically significant. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 8 software. All data are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean.

3. Results

3.1 *Rubus* sp. extract and metformin prevented memory deficits induced by STZ

The results of the behavioral tests are shown in Figure 2. In the open field test, no changes were observed in the locomotor activity of the animals ($P>0.05$), which excludes the possibility locomotor deficits interfering in memory tasks (Figure 2A). In the object recognition test, the animals of STZ group showed a reduction in the exploration time of the new object when compared to control group ($P<0.05$ Fig. 2B) indicating memory impairment. However, all treatments tested (*Rubus* sp. extract 100 or 200 mg/kg and metformin) were able to prevent this memory dysfunction as evidenced by the increase in the exploration time of new object (Fig. 2B). In the Y-maze test, the STZ group showed a reduction in the time spent in the new arm and an increase in the time spent in the initial or familiar arm ($P<0.05$ Fig. 2D). However, the number of entries into the arms did not differ significantly when compared to other groups (Fig. 2C). The group treated with *Rubus* sp. 200 mg/kg and the metformin group attenuated the memory deficit induced by the STZ and showed a longer time spent in the new arm, demonstrating an improvement in the animals' special memory.

3.2 *Rubus* sp. extract and metformin prevent the increase in AChE Activity induced by STZ

The results of AChE activity in the hippocampus are shown in Figure 3. Animals that received icv-STZ showed an increase in AChE activity in hippocampus compared to control group ($P < 0.001$ Fig.3). However, *Rubus* sp. extract (200 mg/kg) and metformin (150 mg/kg) were able to prevent this increase in AChE activity in hippocampus compared to STZ group (Fig. 3).

3.3 *Rubus* sp. extract and metformin did not prevent the increase in phosphorylated tau protein in STZ group

In relation to phosphorylated tau protein levels, our results showed an increase in hippocampus of the STZ group compared to control group ($P<0.05$ Fig 4). However, treatment with *Rubus* sp. or metformin were not able to prevent changes in phosphorylated tau protein levels.

3.4 *Rubus* sp. extract and metformin prevents alterations in hippocampal cytokines

Figure 5 shows the levels of IL-6 and IL-10 in hippocampus of rats submitted to a model of sporadic dementia of Alzheimer's type induced by STZ. As can be observed, STZ induced an increase in IL-6 levels in hippocampus when compared to control group ($P < 0.01$ Fig. 5A). Both doses of *Rubus* sp. extract (100 and 200 mg/kg) and metformin (150 mg/kg) were capable to reduce the level of this pro-inflammatory cytokine in the hippocampus. Additionally, STZ also induced a decrease in levels of IL-10 in the hippocampus ($P < 0.01$ Fig. 5B). However, only the treatment with the extract of *Rubus* sp. (100 mg/kg) was able to increase the levels of this cytokine compared to STZ group (Fig 5B).

3.5 mRNA expression of GSK-3 β , Nrf2, AKT1, IRS-1 and FOXO3a is altered in hippocampus

Figure 6 shows that STZ administration induced an increase in relative mRNA expression of GSK3 β and Nrf2 in the hippocampus when compared to control group ($P < 0.05$). However, it is possible to observe that treatment with *Rubus* sp. extract (100 and 200 mg/kg) and metformin (150 mg/kg) down regulated the relative mRNA expression of GSK3 β and Nrf2 when compared to animals exposed only STZ (Fig. 6C and 6D). Additionally, STZ also induced a down-regulation of gene expression of Akt 1, IRS-1, and FOXO3a ($P < 0.05$). However, no treatment was able to prevent this down-regulation gene expression induced by the model of sporadic dementia of Alzheimer's type (Fig. 6A, 6B e 6D).

3.6 *Rubus* sp. extract and metformin prevented oxidative damage

Figure 7 shows that the administration of STZ induced oxidative damage in hippocampus. In the STZ group, was observed an increase in ROS, TBARS, and nitrites, as well as a reduction in SH content, CAT, and GST activities when compared to control group ($P < 0.05$ Fig. 7 A-G). Treatment with *Rubus* sp. (200 mg/kg) resulted in a reduction in ROS, TBARS, nitrite levels, and an increase in SH content and CAT activity when compared to the STZ group (Fig. 7). Metformin treatment prevented the reduction in thiol content, and CAT e GST activities induced by STZ in the hippocampus. However, neither *Rubus* sp. nor metformin was able to prevent the changes in SOD activity induced by STZ (Fig.7 E).

3.7 The model of sporadic dementia of Alzheimer's type induced by STZ did not alter glucose and insulin levels

Figure 8 demonstrates the levels of glucose in serum and insulin levels in serum and cerebrospinal fluid in rats submitted to AD model and treated with *Rubus* sp. extract or metformin. As can be observed, no statistical differences were observed in these parameters in any of the evaluated groups (Figure 8 A, B and C).

4. Discussion

STZ is widely used to induce experimental diabetes [34] However, when administered in the brain, STZ induces alterations that resemble molecular, neurochemical, and behavioral features of AD such as memory loss, oxidative stress, cholinergic system dysfunction, inflammatory process, tau protein phosphorylation and disturbances in brain glucose metabolism [15, 22, 23, 35]. In this study, we demonstrated that *Rubus* sp. extract and metformin were capable of preventing cognitive and neurochemical changes induced by a non – transgenic model of AD in rats.

Hippocampus is considered an integration center for cognitive functions, playing crucial roles in memory acquisition and consolidation. Moreover, adult hippocampal neurogenesis generates newborn neurons that are incorporated in neural circuits of the hippocampus, specifically in the dentate gyrus and sub-regions CA1-CA3, thereby playing an important role in the hippocampus-dependent learning and memory [36,37]. The hippocampus and its connected structures are particularly vulnerable to damage in the early stages of AD [38].

In the present study, we showed biochemical and molecular alterations induced by AD model in hippocampus. These alterations included an increase in AChE activity, phosphorylated tau protein, IL- 6, oxidative damage, and an up-regulation of GSK3 β and Nrf2 gene expression, as well as and downregulation Akt1, IRS-1 and FOXO3a gene expression. These hippocampal alterations may be associated with memory deficits observed in the animals. However, blackberry and metformin were able to prevent memory impairment. Our findings corroborate with previous studies from literature that have also demonstrated an improvement in memory and learning after treatment with intranasal or oral

metformin for 4 weeks in mice submitted to AD model induced by STZ [39]. Memory improvement was also observed in rats treated with *Rubus* sp extract (100 and 200 mg/kg) in amnesia model induced by scopolamine [21]. *Rubus* sp extract prevented memory impairment in a manner similar to that of donepezil, an anticholinesterase drug used in AD treatment [21].

Cholinergic dysfunction is one of the most important features of AD and can be observed in the early stages of the disease [40]. Considering that cholinergic system is closely related to memory deficits, cholinesterase inhibitors are an important class of drugs used in AD treatment [8]. AChE is a serine hydrolase responsible for degrading the acetylcholine neurotransmitter. Besides its well-known catalytic function, other roles of this enzyme have been described such as involvement in neurogenesis, cell adhesion and synaptogenesis [41]. Additionally, since acetylcholine modulates the production of inflammatory cytokines, AChE also plays a crucial role in the inflammatory process [42]. Our findings demonstrate that STZ induces an increase in AChE activity in the hippocampus. This enzymatic alteration can decrease the levels of acetylcholine levels in brain and may explain, at least in part, the memory deficits and alterations in cytokines levels in hippocampus.

Treatment with blackberry extract and metformin was capable to preventing alterations in AChE activity. Although metformin decreased the AChE activity in our experimental model, Aksoz and collaborators [43] showed that this drug does not increase acetylcholine levels in the hippocampus in a rat model of scopolamine-induced learning and memory impairment. The effects of blackberry extract on AChE corroborate with another study conducted by our research group, which also demonstrated a decrease in this enzyme activity in brain structures such as cerebral cortex, cerebellum and hippocampus in a rodent model of amnesia [21].

Besides cholinergic dysfunction, another mechanism that has been associated with development and progression of DA is cerebral glucose hypometabolism [7]. Although the exact mechanism involved in the effects of STZ in brain is not yet well elucidated, it has been suggested that STZ induces dysfunctions in glucose metabolism by desensitizing brain insulin receptors [44]. Regarding insulin signaling, some molecules are crucial, such as IRS-1, AKT, and GSK-3 β . In our study, no alterations in insulin levels in serum and

cerebrospinal fluid were observed. However, STZ decreased the gene expression of IRS-1 and AKT1 and increased GSK-3 β in the hippocampus. IRS-1 is a major substrate for the insulin receptor and is involved in the activation of PI3K/Akt pathway deactivation of GSK-3 β [45]. GSK-3 β is primarily expressed in the brain and is responsible for the phosphorylation of tau protein. Tau protein is important for stabilizing microtubules and maintaining synapse activity. When this protein is hyperphosphorylated, it leads to the destabilizing microtubules, culminating to synaptic dysfunction and neuronal death [46]. Based in our findings, we can suggest that decrease IRS-1 gene expression, induced dysfunction in the PI3K/Akt/GSK3 β pathway leading to the activation of GSK3 β signaling and resulting in an increase in phosphorylated tau protein in the hippocampus.

Regarding treatments, no statistical difference was observed in levels of phosphorylated tau protein in animals that received blackberry or metformin when compared to the group that received only STZ. However, there was a tendency towards a decrease in animals treated with blackberry extract (100 mg/kg) and metformin. Nevertheless, the treatments were able to prevent alterations in GSK3 β expression induced by STZ in the hippocampus. Consistent with our results, data from the literature have shown that cyanidin-O-galactoside, the major anthocyanin identified in blackberry extract, also induced a decrease in GSK3 β in hippocampus in a rat model of beta-amyloid peptide-induced cognitive impairment in rats [47].

Neuroinflammation has also been associated with the pathogenesis of AD and appears to occur as a consequence of various mechanisms including signs of neuronal damage and oxidative agents [6]. Basal levels of cytokines play essential roles in the hippocampus; however, an excessive production of these molecules is associated with neurodegeneration [48]. In our study, we demonstrated an increase in IL-6 levels and a decrease in IL-10 levels in the hippocampus of animals that received only STZ. Blackberry extract is rich in phytochemical compounds with anti-inflammatory activity, such as anthocyanins. In this regard, we emphasize that the extract of *Rubus* sp., in both evaluated concentrations, was able to reduce the levels of IL-6. Blackberry extract (100 mg/kg) also increased the levels of IL-10 in the hippocampus. Corroborating with our results, previous studies have reported that blueberry anthocyanins improve

memory by decreasing TNF- α , IL-1 β , IL-6 in the same brain structure evaluated [49]. In addition, metformin has also been shown to have anti-inflammatory effects by modulating the expression of IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α [50].

In the hippocampus, STZ also induced oxidative stress, as evidenced by increase in ROS and nitrite levels and the decrease in thiol content, CAT, and GST activities. These results are consistent with previous studies conducted by our research group using the same experimental model [18,24,51]. ROS are naturally produced in the body through physiological mechanisms; however, the accumulation of high levels of ROS may be related to their overproduction or inadequate clearance [52]. Nitrite is a metabolite of nitric oxide and can contribute to an increase in oxidative stress because it leads to the formation of peroxynitrite [52,53]. Oxidative stress can induce cell membrane damage, changes in protein function, structural damage to DNA, and mitochondrial dysfunction culminating with increase in inflammatory cytokines, such as IL-6, and memory loss [53, 54].

In the animals treated only with STZ, our results showed an increase in Nrf2 gene expression and a decrease in FOXO 3a gene expression. Nrf2 is an important transcription factor involved in cellular resistance to oxidants. In the presence of reactive species, Nrf2 translocate from the cytoplasm into the nucleus and binds to the antioxidant response element (ARE), which up regulates the expression of several antioxidant and anti-inflammatory genes [55]. Therefore, the increase in the Nrf2 gene caused by STZ may be to the increase of the ROS in hippocampus. On the other hand, STZ induced a decrease in FOXO3a gene expression. FOXO3a is a transcription factor associated with cell proliferation, apoptosis, and autophagy and as critical regulator of redox imbalance [56]. It has been described that overexpression of FOXO3a inhibited the secretion of inflammatory cytokines and increase the antioxidant enzymes [57]. Therefore, the decreased gene expression of this transcription factor can be associated with oxidative damage and cytokines levels in hippocampus.

Treatment with blackberry extract prevented oxidative damage induced by STZ. *Rubus sp.* decreased ROS, nitrite and TBARS levels, and increased CAT and GST activities in the hippocampus. Blackberry contain phytochemical compounds with a high antioxidant power such as anthocyanins [58]. Recently we also demonstrated that blackberry extract prevented oxidative damage induced *in vitro* by H₂O₂ plus FeSO₄ in brain homogenate [21]. In addition,

phytochemicals present in this fruit also prevented brain oxidative stress induced by an amnesia model in rats [21]. Studies from literature have shown that antioxidant mechanism of anthocyanins and others phenolic compounds included the stimulation of the activities the endogenous antioxidant defense system [18], inhibition of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase enzyme, scavenging of free radicals [59], improvement mitochondrial functionality [60], and upregulation of transcription factor Nrf2 [61].

Metformin also prevented alterations induced by STZ on thiol content, as well as CAT and GST activities in the hippocampus. Other studies have also reported that metformin decreases lipid peroxidation and improves the activities of antioxidant enzymes in serum of alloxan-induced diabetes in rats [62]. Additionally, metformin decreases lipid peroxidation and increases the SOD activity in the brain of a transgenic mouse model of AD [63]. Taken together, these findings indicate that metformin could decrease oxidative stress, an important mechanism associated with neurodegeneration.

Finally, considering that STZ induced alterations in brain glucose metabolism, in this study, we used the metformin as positive control and demonstrated that *Rubus sp.* have similar effects to metformin. *Rubus sp.* improved memory and exhibited multitarget actions in the hippocampus, highlighting its potential therapeutic effects and strong neuroprotective action in an model of AD. However, further studies are needed to fully understand the mechanism of action and the clinical applications of *Rubus sp.* in AD.

Acknowledgments

The authors acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

References

[1] Livingston G, Huntley J, Sommerlad A, Ames D, Ballard C, Banerjee S, Brayne C, Burns A, Cohen-Mansfield J, Cooper C. et al. Dementia Prevention,

Intervention, and Care: 2020 Report of the Lancet Commission. *Lancet* 2020; 396: 413–446. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30367](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30367).

[2] Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* 2020; 25:5789. <https://doi.org/10.3390/molecules25245789>.

[3] Zhang XX, Tian Y, Wang ZT, Ma YH, Tan L, Yu JT. The Epidemiology of Alzheimer's Disease Modifiable Risk Factors and Prevention. *J Prev Alzheimers Dis* 2021;8: 313-321. <https://doi.org/10.14283/jpad.2021.15>.

[4] Zhang H, Wei W, Zhao M, Ma L, Jiang X, Pei H, Cao Y, Li H. Interaction between A β and Tau in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int J Biol Sci* 2021; 17: 2181-2192. <https://doi.org/10.7150/ijbs.57078>.

[5] Bai R, Guo J, Ye XY, Xie Y, Xie T. Oxidative stress: The core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 2022; 77:101619. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101619>.

[6] Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol* 2021; 17:157-172. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>.

[7] An Y, Varma VR, Varma S, Casanova R, Dammer E, Pletnikova O, Chia CW, Egan JM, Ferrucci L, Troncoso J, Levey AI, Lah J, Seyfried NT, Legido-Quigley C, O'Brien R, Thambisetty M. Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2018; 14: 318-329. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.09.011>.

[8] Sharma K Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics. *Mol Med Rep* 2019; 20:1479-1487. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10374>.

[9] Beshir SA, Aadithsoorya AM, Parveen A, Goh SSL, Hussain N, Menon VB. Aducanumab Therapy to Treat Alzheimer's Disease: A Narrative Review. *Alzheimers Dis* 2022, 9: 9343514. <https://doi.org/10.1155/2022/9343514>.

[10] Michailidis M, Tata DA, Moraitou D, Kawadas D, Karachrysafi S, Papamitsou T, Vareltzis P, Papaliagkas V Antidiabetic Drugs in the Treatment

of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 2022; 23:4641. <https://doi.org/10.3390/ijms23094641>.

[11] Koo BK, Kim LK, Lee JY, Moon MK. Taking metformin and cognitive function change in older patients with diabetes. *Geriatr Gerontol Int* 2019, 19: 755-761 <https://doi.org/10.1111/ggi.13692>.

[12] Pomilio C, Pérez NG, Calandri I, Crivelli L, Allegri R, Sevrer G, Saravia F (2022). Diabetic patients treated with metformin during early stages of Alzheimer's disease show a better integral performance: data from ADNI study. *Geroscience* 2022; 44:1791-1805. <https://doi.org/10.1007/s11357-022-00568-6>

[13] Ou Z, Kong X, Sun X, He X, Zhang L, Gong Z, Huang J, Xu B, Long D, Li J, Li Q, Xu L, Xuan A. Metformin treatment prevents amyloid plaque deposition and memory impairment in APP/PS1 mice. *Brain Behav Immun* 2018; 69:351-363. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.12.009>.

[14] Nassar SZ, Badae, NM, Issa YA. Effect of amylin on memory and central insulin resistance in a rat model of Alzheimer's disease. *Arch Physiol Biochem* 2018; 126: 326-334. <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1534244>

[15] Pilipenko V, Narbutė K, Pupure J, Langrate IK, Muceniece R, Kluša V (2020). Neuroprotective potential of antihyperglycemic drug metformin in streptozocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 2020; 881: 173290 <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173290>

[16] Saffari PM, Alijanpour S, Takzaree N, Sahebgharani M, Etemad-Moghadam S, Noorbakhsh F, Partoazar A. Metformin loaded phosphatidylserine nanoliposomes improve memory deficit and reduce neuroinflammation in streptozotocin-induced Alzheimer's disease model. *Life Sci* 2020; 225: 117861. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117861>

[17] Gutierrez JM, Carvalho FB, Schetinger PC, 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. Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by

streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. Life Sci 2014; 96: 7-17. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.11.014>

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

[19] Chaves V, Soares MS, Spohr L, Teixeira L, Vieira A, Constantino L, Dal Pizzol F, Lencina C, Spanevello RM, Freitas M, Simões CM, Reginatto F, Stefanello F. Blackberry extract improves behavioral and neurochemical dysfunctions in a ketamine induced rat's model of mania. Neurosci Lett 2020; 714: 134566. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.02.014>.

[20] Soares MSP, Luduvico KPL, Chaves VC, Spohr L, Meine BM, Lencina CL, Reginatto FH, Spanevello RM, Simões CMO, Stefanello FM. The Protective Action of *Rubus* sp. Fruit Extract Against Oxidative Damage in Mice Exposed to Lipopolysaccharide. Neurochem Res 2021; 5: 1129–1140. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03248-7>.

[21] De Mello JE, Luduvico KP, Santos A, Teixeira FC, Cardoso JS, Aguiar MSS, Cunico W, Vizzotto M, Stefanello F, Spanevello R (2023). Therapeutic potential of blackberry extract in the preventing memory deficits and neurochemical alterations in the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of a rat model with amnesia. Metab Brain Dis. 2023. <https://doi.org/10.1007/s11011-023-01175-w>.

[22] Shonesya BC, Thiruchelvama K, Parameshwarana K, Rahmana EA, Karuppagoundera SS, Hugginsb KW, Pinkertc CA, Amina R, Dhanasekarana M, Suppiramaniam V. Central insulin resistance and synaptic dysfunction in intracerebroventricular-streptozotocin injected rodents. Neurobiol Aging 2012; 33: 5-18. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.12.002>.

[23] Knezovic A, Osmanovic-Barilar J, Curlin M, Hof PR, Simic G, Riederer P, Salkovic-Petrisic M. Staging of cognitive deficits and neuropathological and

ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2015; 122: 577–592. <https://doi.org/10.1007/s00702-015-1394-4>

[24] Teixeira FC, Gutierrez JM, Soares MSP, Mattos B, Spohr L, Couto CAT, Bona N, Assmann C, Morsch VM, Cruz IBM, Stefanello FM, Spanevello RM. Inosine protects against impairment of memory induced by experimental model of Alzheimer disease: a nucleoside with multitarget brain actions. *Psychopharmacol* 2020; 237: 811-823. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05419-5>

[25] Ellman G, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88-95

[26] Ali SF, Lebel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicol* 1992; 13:637-648.

[27] Esterbauer H, Cheeseman K. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; 186: 407-421

[28] Huang WC, Lin YS, Wang CY, Tsai CC, Tseng HC, Chen CL, Lu PJ, Chen PS, Qian L, Hong J, Lin C. Glycogen synthase kinase-3 negatively regulates anti-inflammatory interleukin-10 for lipopolysaccharide-induced iNOS/NO biosynthesis and RANTES production in microglial cells. *Immunology* 2009; 128:275-286 in Rats. *Mol Neurobiol* 54: 6507–6522. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02959.x>.

[29] Aksenov MY, Markesbery WR. Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosc Letters* 2001; 302: 141-145.

[30] 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.

- [31] Aebi H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 1984; 105: 121–126.
- [32] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- [33] Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein– dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–254.
- [34] Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc* 2021; 4: e78. <https://doi.org/10.1002/cpz1.78>.
- [35] Guo Z, Chen Y, Mao YF, Zheng T, Jiang Y, Yan Y. Longterm treatment with intranasal insulin ameliorates cognitive impairment, tau hyperphosphorylation, and microglial activation in a streptozotocin-induced Alzheimer's rat model. *Sci Rep* 2017; 7: 45971. <https://doi.org/10.1038/srep45971>.
- [36] Opitz B. Memory function and the hippocampus. *Front Neurol Neurosci* 2014; 34:51-59. <https://doi.org/10.1159/000356422>.
- [37] Bassani TB, Bonato JM, Machado MMF, Cópola-Segovia V, Moura ELR, Zanata SM, Oliveira RMMW, Vital MABF. Decrease in Adult Neurogenesis and Neuroinflammation Are Involved in Spatial Memory Impairment in the Streptozotocin-Induced Model of Sporadic Alzheimer's Disease in Rats. *Mol Neurobiol* 2018; 55:4280–4296. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0645-9>.
- [38] Rao YL, Ganaraja B, Murlimanju BV, Joy T, Krishnamurthy A, Agrawal A. Hippocampus and its involvement in Alzheimer's disease: a review. *3 Biotech* 2022; 12:55. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03123-4>.
- [39] Kazkayasi I, Telli G, Nemutlu E, Uma S. Intranasal metformin treatment ameliorates cognitive functions via insulin signaling pathway in ICV-STZ-induced mice model of Alzheimer's disease. *Life Sci* 2022; 299:120538. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120538>.

- [40] Ferreira-Vieira T, Guimaraes I, Silva F, Ribeiro F. Alzheimer's Disease: Targeting the cholinergic system. *Curr Neuropharmacol* 2016; 14: 101-115. <https://doi.org/10.2174/1570159x13666150716165726>.
- [41] Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2002; 2: 294–302. <https://doi.org/10.1038/35067589>.
- [42] Piovesana R, Salazar Intriago MS, Dini L, Tata AM. Cholinergic Modulation of Neuroinflammation: Focus on $\alpha 7$ Nicotinic Receptor. *Int J Mol Sci* 2021; 22:4912. <https://doi.org/10.3390/ijms22094912>.
- [43] Aksoz E, Gocmez SS, Sahin TD, Aksit D, Aksit H, Utkan T. The protective effect of metformin in scopolamine-induced learning and memory impairment in rats. *Pharmacol Rep* 2019; 71: 818-825. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2019.04.015>.
- [44] Grieb P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Mol Neurobiol* 53: 1741-1752. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9132-3>.
- [45] Xiong R, Wang X, Wu J, Tang Y, Qiu W, Shen X, Teng J, Pan R, Yu Y, Liu J, Chen H, Qin D, Yu C, Wu A. Polyphenols isolated from lychee seed inhibit Alzheimer's disease-associated Tau through improving insulin resistance via the IRS-1/PI3K/Akt/GSK-3 β pathway. *J Ethnopharmacol* 2020; 251: 112548. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112548>
- [46] Revett TJ, Baker GB, Jhamandas J, Kar S. Glutamate system, amyloid (beta) peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *J Psych Neurosci* 2013; 38: 6-23. <https://doi.org/10.1503/jpn.110190>
- [47] Qin L, Zhang J, Qin M. Protective effect of cyanidin 3-O-glucoside on beta-amyloid peptide-induced cognitive impairment in rats. *Neurosci Lett* 2013; 534:285-8. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.12.023>.
- [48] De Oliveira AC, Candelario-Jalil E, Fiebich BL, Santos Mda S, Palotás A, dos Reis HJ. Neuroinflammation and Neurodegeneration: Pinpointing Pathological

and Pharmacological Targets. Biomed Res Int 2015; 2015:487241. <https://doi.org/10.1016/10.1155/2015/487241>.

[49] Amin FU, Shah SA, Badshah H, Khan M, Kim MO. Anthocyanins encapsulated by PLGA@PEG nanoparticles potentially improved its free radical scavenging capabilities via p38/JNK pathway against A β 1–42-induced oxidative stress. J Nanobiotechnol 2017;15:12. <https://doi.org/10.1186/s12951-016>

[50] Hammad AM, Ibrahim YA, Khdaib SI, Hall FS, Alfaraj M, Jarrar Y, Abed AF. Metformin reduces oxandrolone- induced depression-like behavior in rats via modulating the expression of IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α . Behav Brain Res. 2021; 414:113475. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113475>.

[51] Dos Santos A, Teixeira FC, da Silva DS, Veleza TA, de Mello JE, Luduvico KP, Tavares RG, Stefanello FM, Cunico W, Spanevello RM. Thiazolidin-4-one prevents against memory deficits, increase in phosphorylated tau protein, oxidative damage and cholinergic dysfunction in Alzheimer disease model: Comparison with donepezil drug. Brain Res Bull 2023 193:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.11.015>.

[52] Demirci-Çekiç S, Özkan G, Avan AN, Uzunboy S, Çapanoğlu E, Apak R. Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. J Pharm Biomed Anal 2022; 209:114477. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114477>.

[53] Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. Nat Rev Drug Discov 2021; 20:689-709. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00233-1>.

[54] Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. Molecules 2019; 22:1583. <https://doi.org/10.3390/molecules24081583>.

[55] Davies DA, Adlimoghaddam A, Albenzi BC. Role of Nrf2 in Synaptic Plasticity and Memory in Alzheimer's Disease. Cells 2021 10:1884. <https://doi.org/10.3390/cells10081884>.

- [56] Nho RS, Hergert P. FoxO3a and disease progression. *World J Biol Chem* 2014; 5:346-54. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v5.i3.346>
- [57] Xu S, Zhang X, Ma Y, Chen Y, Xie H, Yu L, Wang J, Xu SQ, Pan F. FOXO3a Alleviates the Inflammation and Oxidative Stress *via* Regulating TGF- β and HO-1 in Ankylosing Spondylitis. *Front Immunol.* 2022 13:935534. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.935534>.
- [58] Bendokas V, Stanys V, Mažeikienė I, Trumbeckaitė S, Baniene R, Liobikas J. Anthocyanins: From the Field to the Antioxidants in the Body. *Antioxidants (Basel)*. 2020; 9:819. <https://doi.org/10.3390/antiox9090819>.
- [59] Borkowski T, Szymusiak H, Gliszczyńska-Rwigło A, Rietjens IM, Tyrakowska B Radical scavenging capacity of wine anthocyanins is strongly pH-dependent. *J Agric Food Chem* 2005; 53:5526-34. <https://doi.org/10.1021/jf0478556>. PMID: 15998109
- [60] Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Mazzoni L, Forbes-Hernandez TY, Gasparri M, González-Paramàs AM, Santos-Buelga C, Quiles JL, Bompadre S, Mezzetti B, Battino M. Polyphenol-rich strawberry extract protects human dermal fibroblasts against hydrogen peroxide oxidative damage and improves mitochondrial functionality. *Molecules* 2014, 19:7798-816. <https://doi.org/10.3390/molecules19067798>.
- [61] Zhang B, Buya M, Qin W, Sun C, Cai H, Xie Q, Xu B, Wu Y. Anthocyanins from Chinese bayberry extract activate transcription factor Nrf2 in β cells and negatively regulate oxidative stress-induced autophagy. *J Agric Food Chem* 2013 61:8765-72. <https://doi.org/10.1021/jf4012399>.
- [62] Chukwunonso Obi B, Chinwuba Okoye T, Okpashi VE, Nonye Igwe C, Olisah Alumanah E. Comparative Study of the Antioxidant Effects of Metformin, Glibenclamide, and Repaglinide in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *J Diabetes Res.* 2016; 2016:1635361. <https://doi.org/10.1155/2016/1635361>.
- [63] Lu XY, Huang S, Chen QB, Zhang D, Li W, Ao R, Leung FC, Zhang Z, Huang J, Tang Y, Zhang SJ. Metformin Ameliorates A β Pathology by Insulin-Degrading

Enzyme in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev* 2020; 19:2020:2315106.

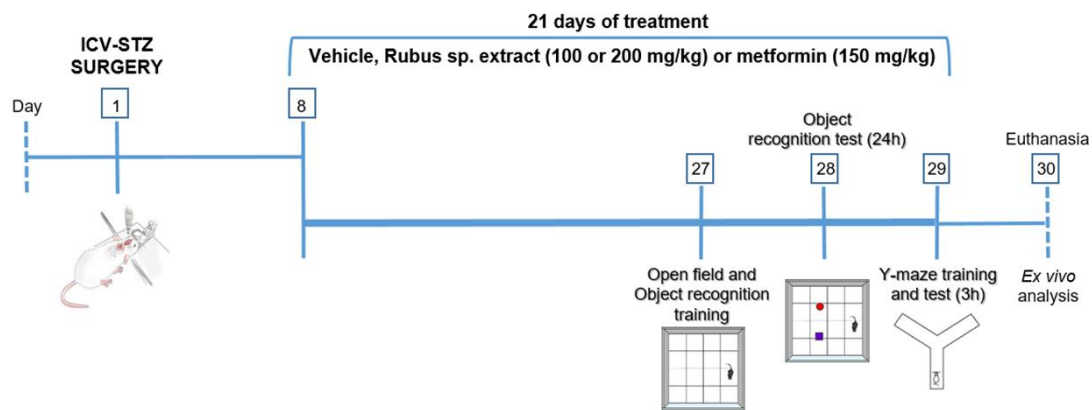


Figure 1 - Scheme of the protocol used to induce the experimental model of sporadic dementia of Alzheimer's type in rats and treatment with *Rubus* sp. extract (100 and 200mg/kg) and metformin (150 mg/kg).

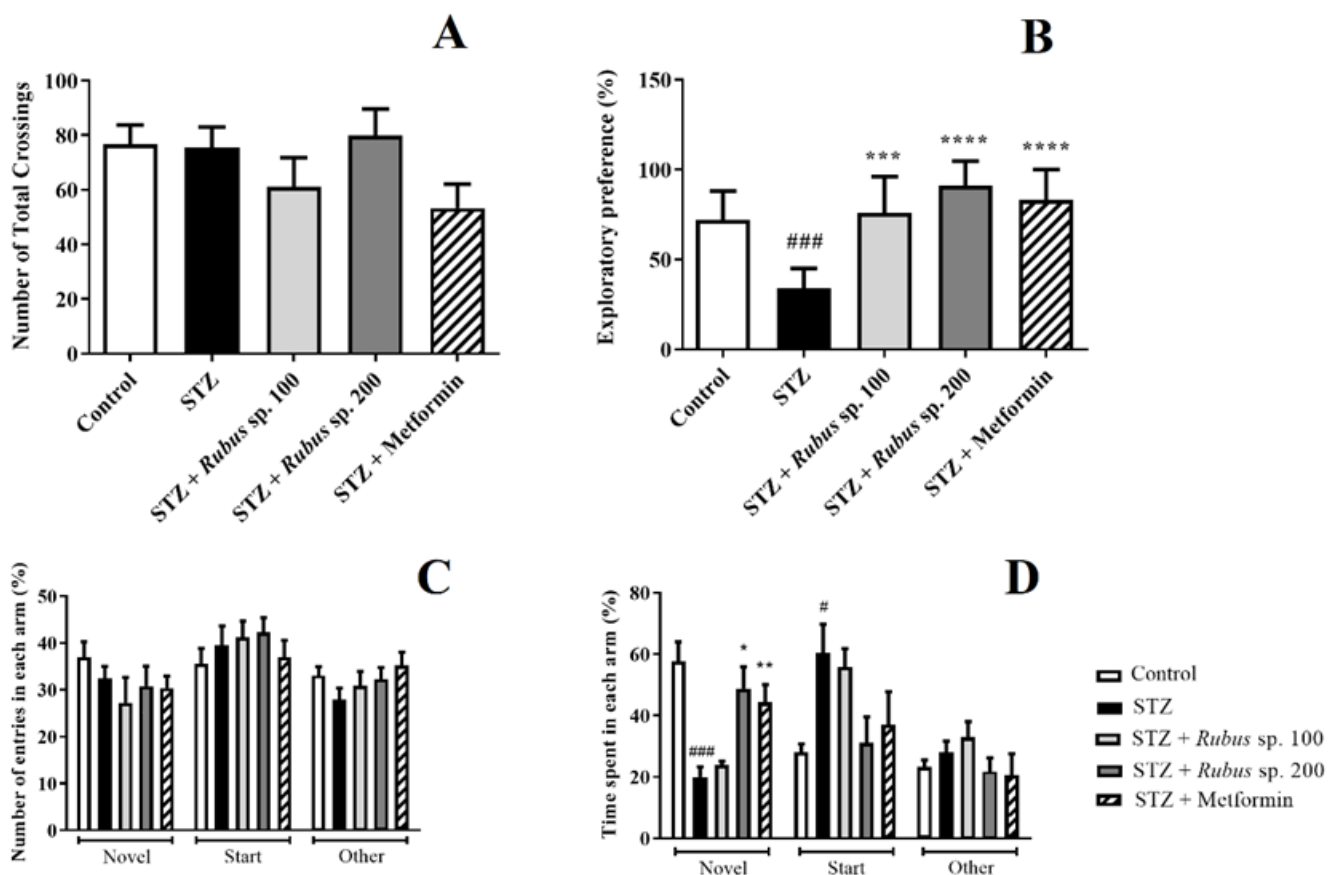


Figure 2 - Effects of treatment with *Rubus* sp. extract (100 or 200 mg/kg) and metformin (150 mg/kg) on locomotor activity in the open field test (A) and memory in the object recognition test (B) and Y-maze test (C and D) in a model of sporadic dementia of Alzheimer's type induced by streptozotocin (STZ 3 mg/kg). Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. # $P < 0.05$ and ### $P < 0.001$ compared to the control group. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0005$ compared to the STZ group (n = 7-10)

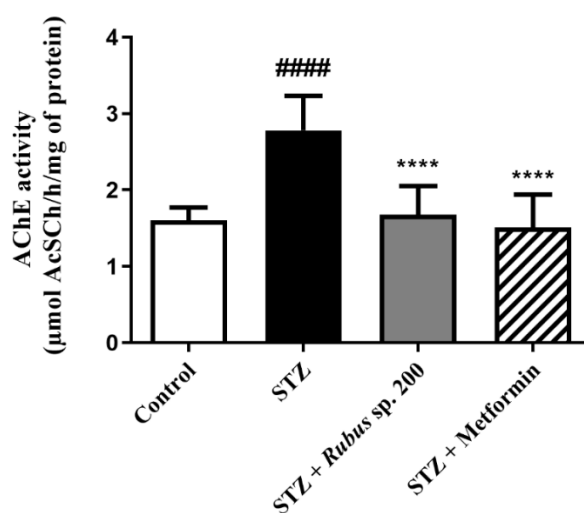


Figure 3 - Effects of *Rubus* sp. extract (200 mg/kg) and metformin (150 mg/kg) on acetylcholinesterase (AChE) activity in hippocampus in a model of sporadic dementia of Alzheimer's type induced by streptozotocin (STZ 3 mg/kg). Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. ##### $P < 0.0005$ compared to the control group. **** $P < 0.0005$ compared to the STZ group (n = 7).

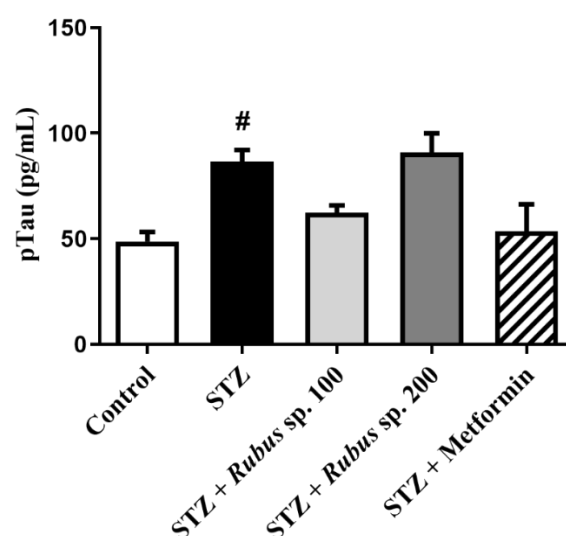


Figure 4 - Effects of treatment with *Rubus* sp. extract (100 or 200 mg/kg) and metformin (150 mg/kg) on phosphorylated tau protein levels (p-Tau) in hippocampus in a model of sporadic dementia of Alzheimer's type induced by streptozotocin (STZ 3 mg/kg). Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. [#] $P < 0.05$ compared to the control group (n=5).

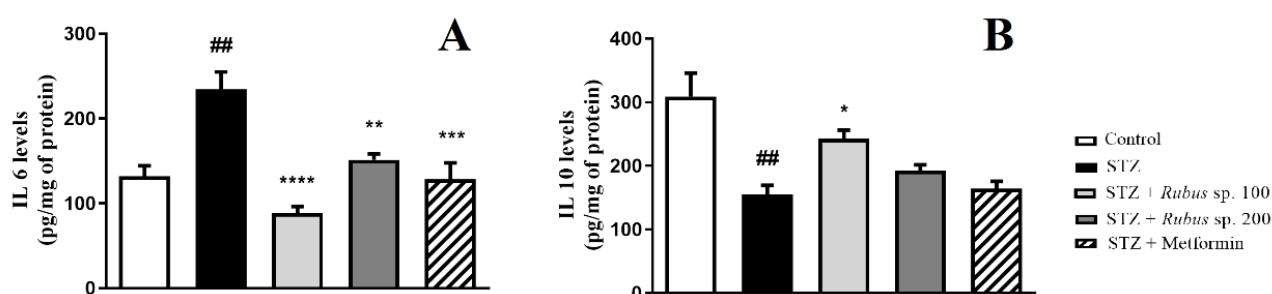


Figure 5 - Effects of treatment with *Rubus* sp. extract (100 or 200 mg/kg) and metformin (150 mg/kg) on IL-6 (A) and IL-10 (B) in hippocampus in a model of sporadic dementia of Alzheimer's type induced by streptozotocin (STZ 3 mg/kg). Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. ^{##} $P < 0.01$ compared to the control group. ^{*} $P < 0.05$; ^{**} $P < 0.01$; ^{***} $P < 0.001$ and ^{****} $P < 0.0005$ compared to the STZ group (n = 5).

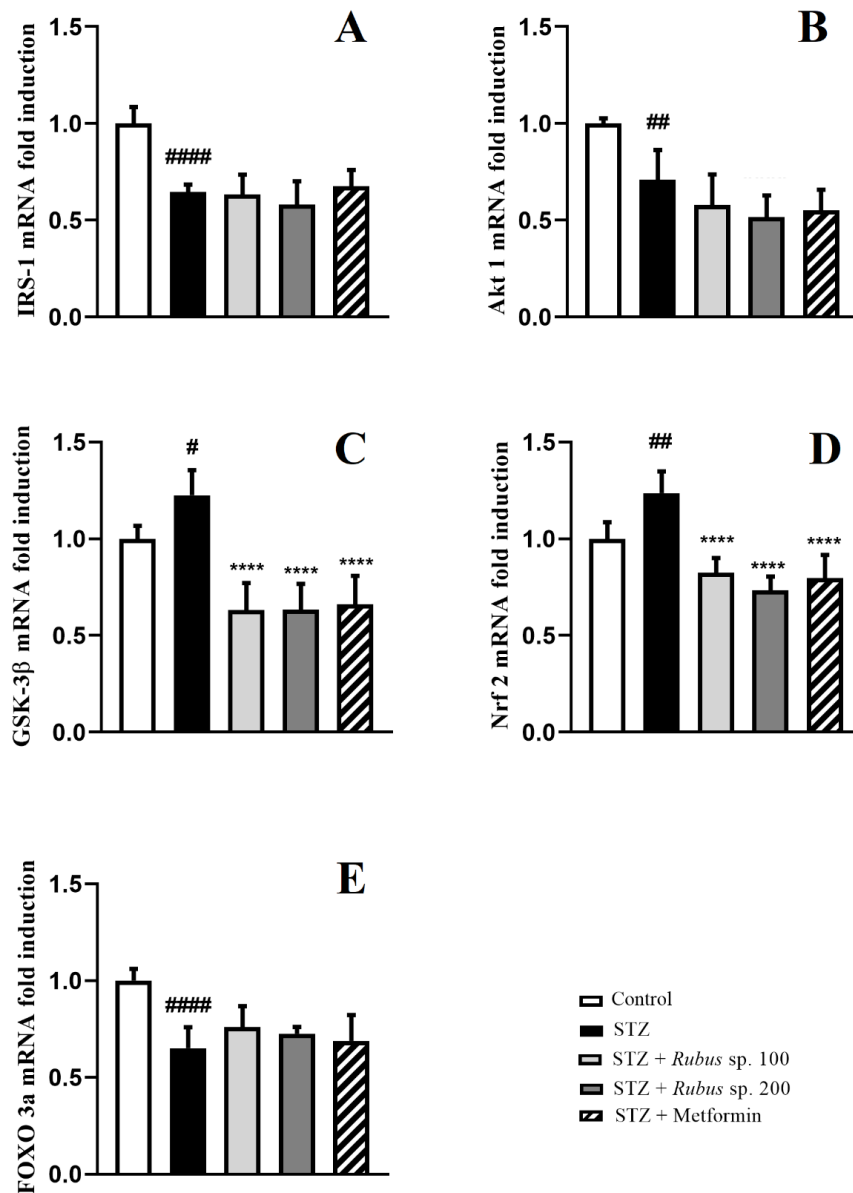


Figure 6 - Effects of treatment with *Rubus* sp. extract (100 or 200 mg/kg) and metformin (150 mg/kg) in mRNA expression of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) (A); V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (Akt 1) (B); glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) (C); nuclear factor erythroid 2 (Nrf2) (D) and Forkhead Box O3 (FOXO 3a) (E) in the hippocampus of rats submitted to a sporadic dementia of Alzheimer's type induced by streptozotocin (STZ 3 mg/kg). Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$ and #### $P < 0.0005$ compared to the control group. **** $P < 0.0005$ compared to the STZ group (n = 6).

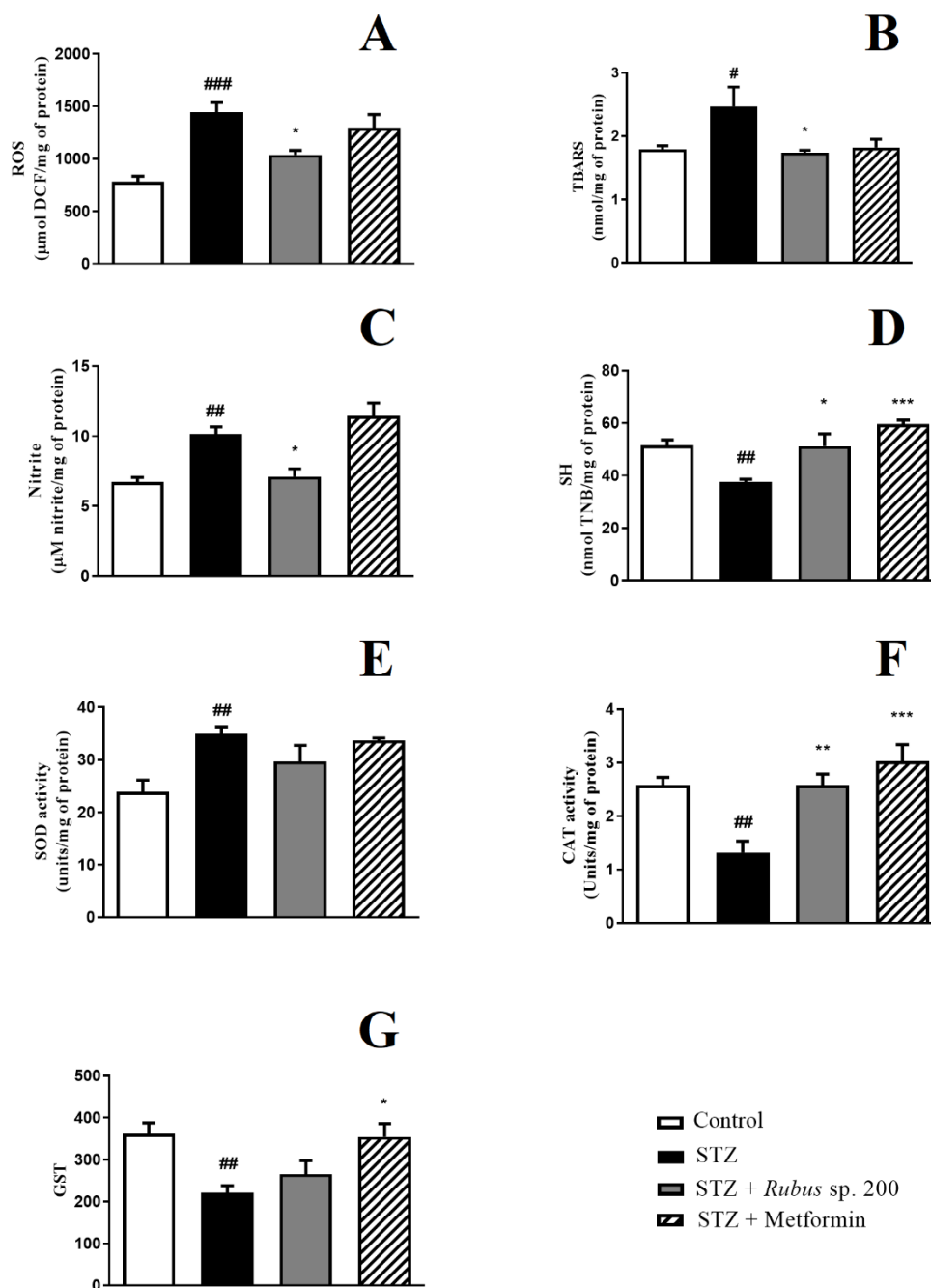


Figure 7 - Effects of treatment with *Rubus* sp. extract (200 mg/kg) and metformin (150 mg/kg) on reactive oxygen species levels (A), thiobarbituric acid reactive substances levels (B), nitrite levels (C), total sulfhydryl content (D), superoxide dismutase activity (E), catalase activity (F) and glutathione s-transferase (G) in hippocampus in a model of sporadic dementia of Alzheimer's type induced by streptozotocin (STZ 3 mg/kg). Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ compared to the control group. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to the STZ group ($n = 5$).

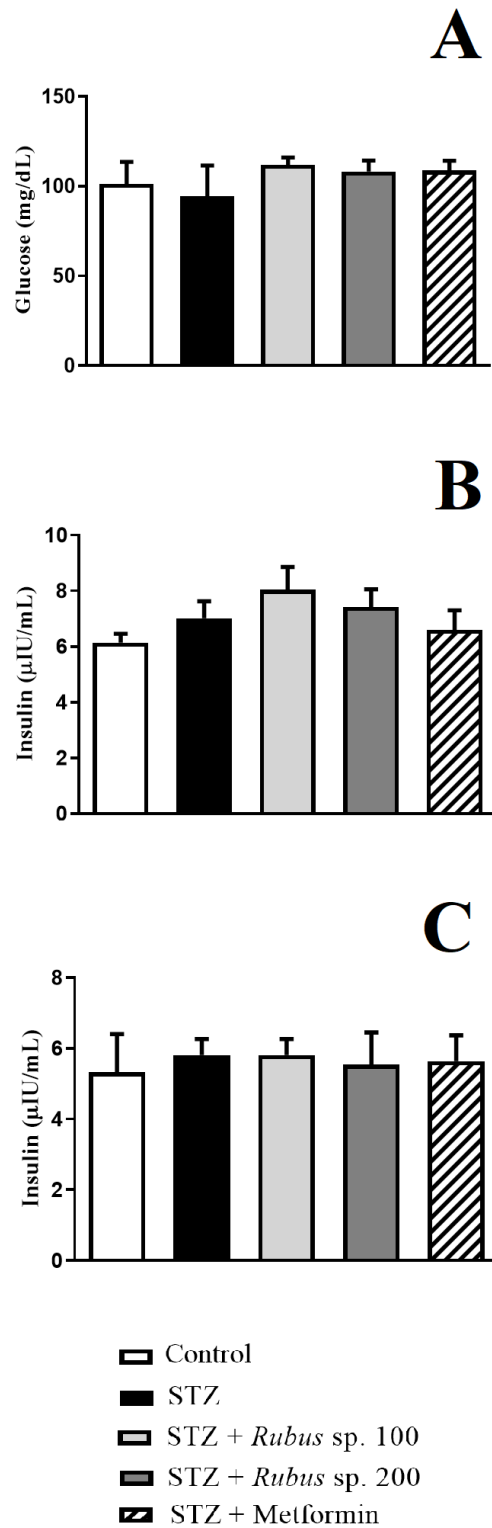


Figure 8 - Effects of treatment with *Rubus* sp. extract (100 or 200 mg/kg) and metformin (150 mg/kg) on glucose levels in serum (A), insulin levels in serum (B), and cerebrospinal fluid (C) in a model of sporadic dementia of Alzheimer's type induced by streptozotocin (STZ 3 mg/kg). Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. (n = 4-5).

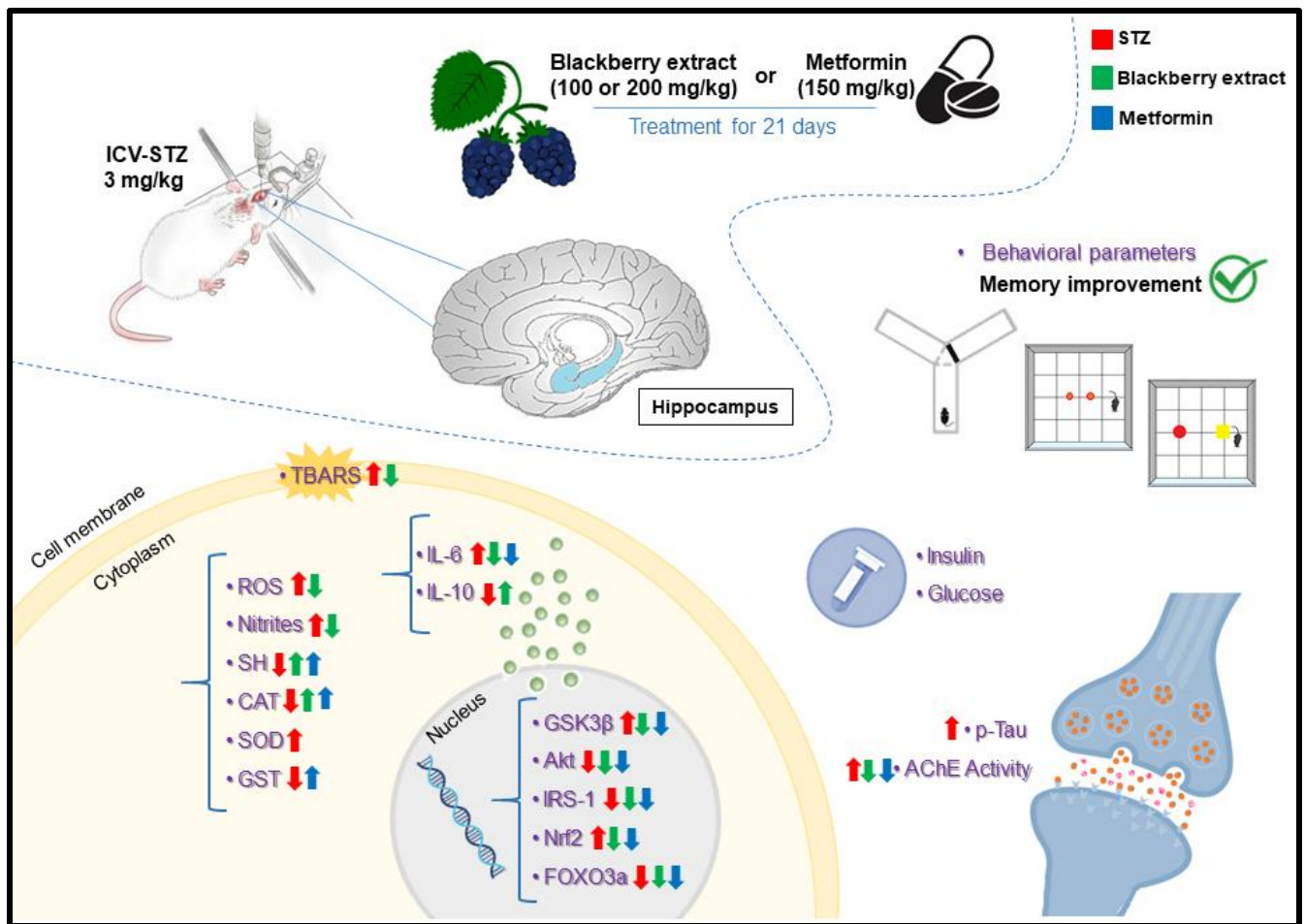
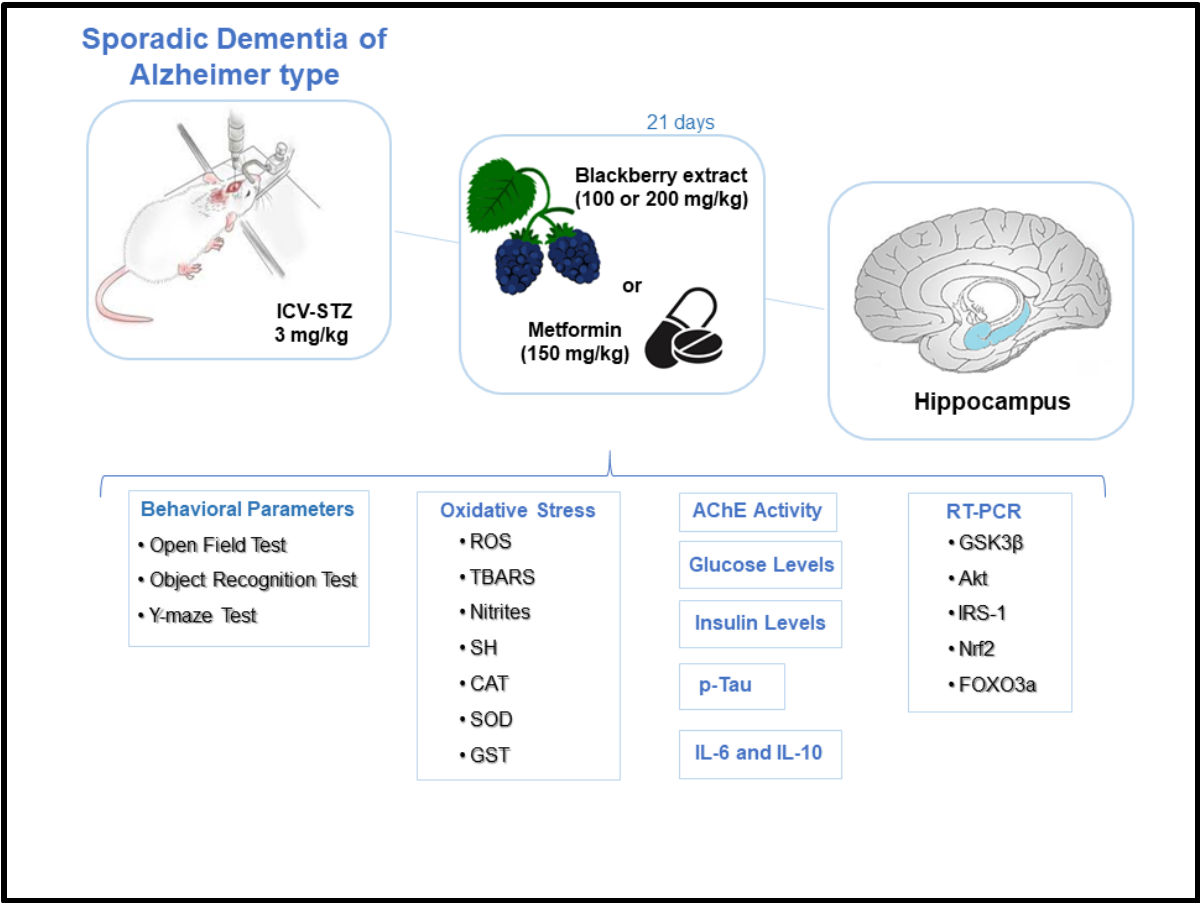


Figure 9 – Overview results. *Rubus sp.* extract prevented memory deficits possibly through the restoration of cholinergic signaling, reduction of neuroinflammation and oxidative damage, and a decrease in the gene expression of GSK3 β in hippocampus the rats submitted to model of sporadic dementia of Alzheimer's type induced by streptozotocin. *Rubus sp.* have similar effects to the drug metformin.

Graphical abstract



4.3 Capítulo 3

Os resultados descritos neste capítulo referem-se às análises em córtex cerebral e cerebelo de ratos submetidos ao protocolo experimental de demência esporádica induzido por STZ e o tratamento com extrato de *Rubus* sp. e de metformina. Entretanto, pelo fato de algumas das análises ainda não terem sido concluídas, serão apresentados os resultados parciais obtidos até o momento, como: parâmetros de estresse oxidativo e atividade da enzima AChE em córtex cerebral e cerebelo e o nível de p-Tau em córtex cerebral.

Inicialmente os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica onde foi realizada a injeção intracerebroventricular de STZ ou de citrato (grupo controle). Após a cirurgia, os animais foram divididos nos seguintes grupos: I – Controle; II – STZ; III – STZ + extrato de amora (100 mg/kg); IV - STZ + extrato de amora (200 mg/kg) e V - STZ + metformina (150 mg/kg). Os grupos receberam os referidos tratamentos por via intragástrica durante 21 dias, ou seja, do 8º ao 29º dia da após a cirurgia da injeção intracerebroventricular de STZ. No final do tratamento, os animais passaram pelos testes comportamentais (nos quais encontra-se no Manuscrito I) previamente à eutanásia para avaliar se os tratamentos foram capazes de reverter os déficits de memória. Sendo assim, os resultados demonstraram o extrato de amora em ambas concentrações avaliadas, bem como a metformina, foram capazes de reverter o déficit de memória induzido pelo STZ no teste de reconhecimento de objetos. Além disso, no teste do labirinto em Y, o extrato de *Rubus* sp., apenas na concentração de 200 mg/kg, e a metformina foram capazes de atenuar o déficit de memória espacial induzido pelo STZ. Cabe destacar que não foram observadas alterações no número de cruzamentos totais no teste de campo aberto.

Em córtex cerebral, foi possível avaliar os níveis da p-Tau, onde foi observado que a STZ aumentou os níveis de p-Tau no córtex, assim como foi observado em hipocampo (descrito no Manuscrito I). Entretanto, diferentemente do que foi observado em hipocampo, os tratamentos avaliados, extrato de *Rubus* sp. (200 mg/kg) e metformina, foram capazes de reduzir os níveis da p-Tau no córtex dos animais (Figura 1).

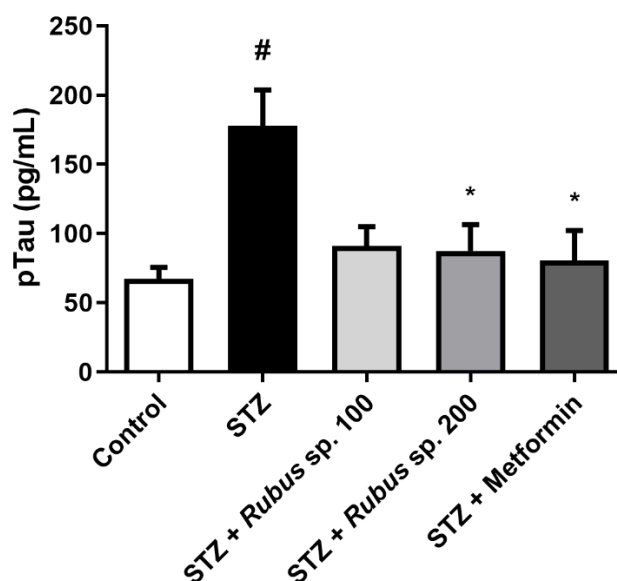


Figura 1: Efeito dos tratamentos com extrato de *Rubus* sp. (100 ou 200 mg/kg) e metformina (150 mg/kg) nos níveis de p-Tau no córtex cerebral de ratos submetidos a um modelo de demência esporádica induzida por STZ (3 mg/kg). Os dados são expressos como a média $\pm$ S.E.M. ($n = 4$). # $P < 0,05$ em comparação com o grupo controle. * $P < 0,05$ em comparação com o grupo STZ ($n = 7$).

Com relação às análises de estresse oxidativo em córtex, foi possível observar um aumento nos níveis de ERO no grupo STZ, e uma redução dessas espécies pelo extrato de *Rubus* sp. 200 mg/kg e pela metformina (Fig. 2A). Ainda, o STZ promoveu uma redução na atividade das enzimas antioxidantes CAT (Fig. 2E), SOD (Fig. 2F) e GST (Fig. 2G) e o extrato de amora preta foi capaz de prevenir todas essas alterações. A metformina foi capaz de prevenir as alterações na atividade da CAT e da SOD. Uma vez que os níveis de ERO podem contribuir com o aumento da peroxidação lipídica, foram avaliados os níveis de TBARS. Desta forma, observou-se que o nível de TBARS foi aumentado significativamente em córtex cerebral, entretanto os tratamentos não foram capazes de reverter esse dano (Fig. 2B). Em relação aos tióis totais, observou-se que em córtex houve uma redução dos tióis quando comparado ao grupo controle, e o extrato de *Rubus* sp. foi capaz de aumentar os níveis de tióis nesta estrutura (Fig. 2D). Na avaliação dos níveis de nitritos em córtex cerebral, não observou-se diferença significativa entre os grupos (Fig. 2C).

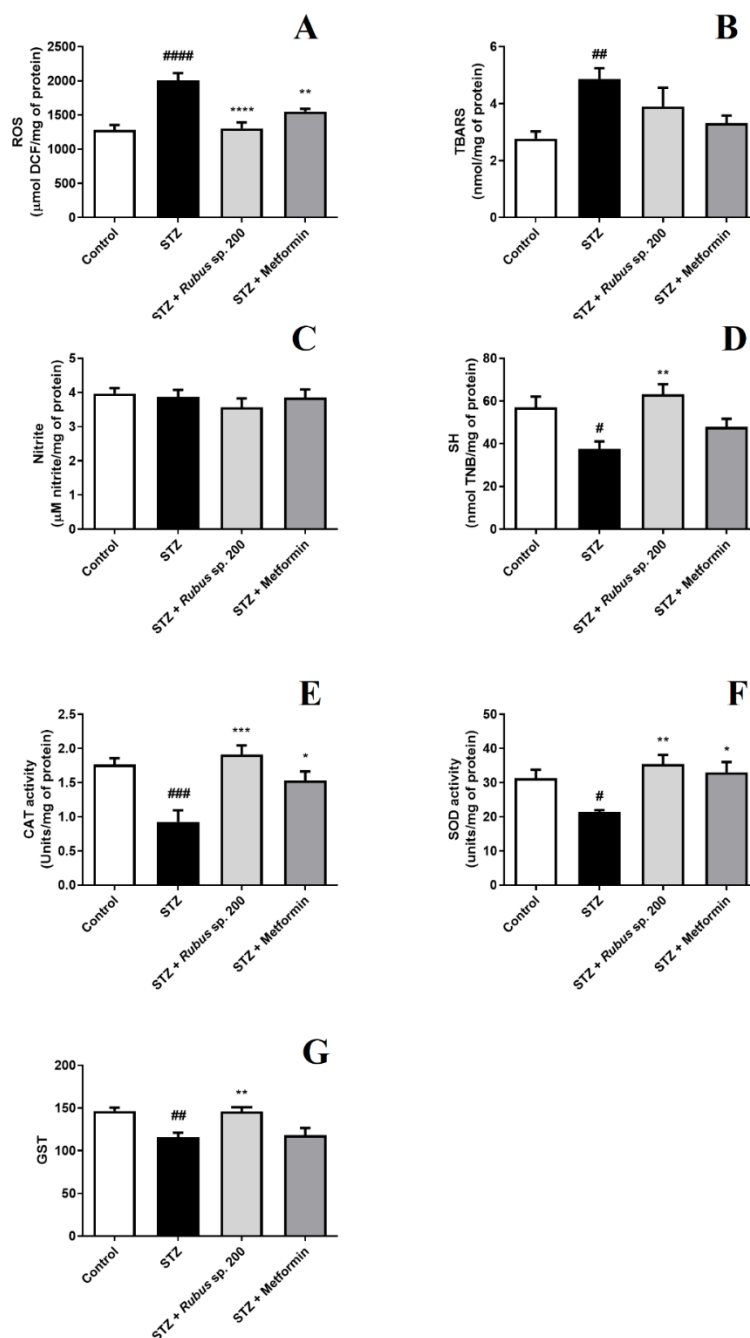


Figura 2: Efeito do extrato de *Rubus* sp. (200 mg/kg) e metformina (150 mg/kg) nos níveis de espécies reativas de oxigênio (A), níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (B), níveis de nitrito (C), conteúdo tiólico total (D), atividade da superóxido dismutase (E), catalase (F) e glutathione s-transferase (G) no córtex cerebral de ratos submetidos a um modelo de demência esporádica induzida por STZ (3 mg/kg). Os dados são expressos como a média $\pm$ S.E.M. # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ e #### $P < 0,0005$ em comparação com o grupo controle. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0005$ em comparação com o grupo STZ ($n = 7$)

Nas análises em cerebelo, observou-se que o STZ promoveu um aumento nas ERO (Fig. 3A), TBARS (Fig. 3B) e nitritos (Fig. 3C) sendo que o extrato de *Rubus* sp. foi capaz de reverter estas alterações. Já a metformina reduziu apenas as espécies de ERO. Com relação à atividade das enzimas antioxidantes, observou-se que o STZ promoveu uma redução na atividade da CAT (Fig. 3E) e um aumento na atividade da GST (Fig. 3G). Entretanto, a metformina foi capaz de aumentar a atividade da CAT e reduzir a atividade da GST no cerebelo, enquanto o extrato de *Rubus* sp. foi capaz de aumentar apenas a atividade da CAT. Na atividade da SOD e nos níveis de tióis não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos (Fig. 3F e Fig. 3D).

Em relação a atividade da AChE em córtex cerebral e cerebelo (Fig. 4A e Fig. 4B), observou-se que o grupo STZ promoveu um aumento na atividade desta enzima em ambas as estruturas avaliadas e o tratamento com extrato de *Rubus* sp. foi capaz de reverter esta alteração em ambas estruturas. Já a metformina reduziu a atividade da AChE apenas em cerebelo (Figura 4).

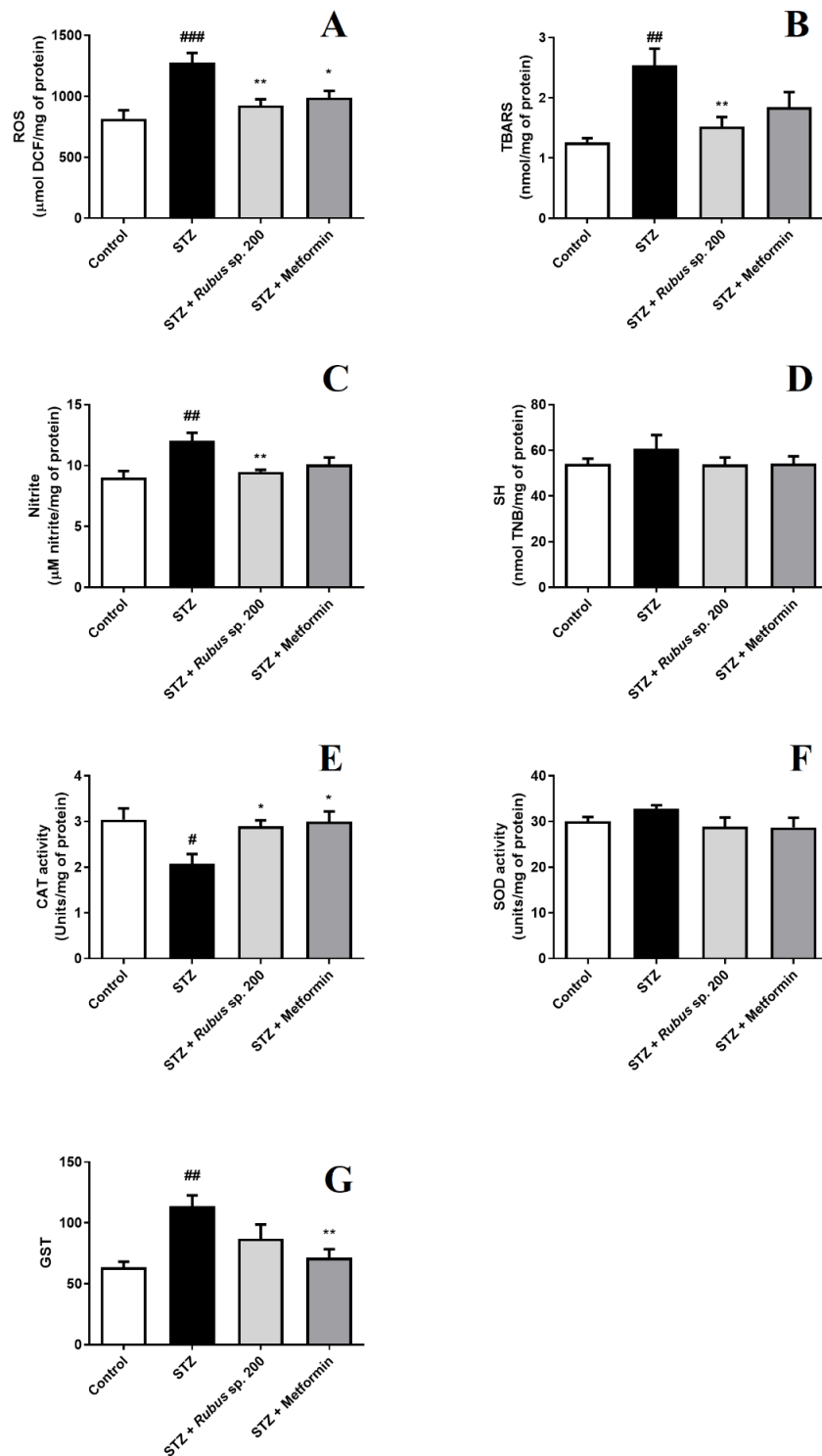


Figura 3: Efeitos do tratamento com extrato de *Rubus* sp. (200 mg/kg) e metformina (150 mg/kg) nos níveis de espécies reativas de oxigênio (A), níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (B), níveis de nitrito (C), teor total de sulfidril (D), atividade de superóxido dismutase (E), catalase (F) e glutiona s-transferase (G) no cerebelo de ratos submetidos a um modelo de demência esporádica induzida por STZ (3 mg/kg). Os dados são expressos como a média $\pm$ S.E.M. # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ em comparação com o grupo controle. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em comparação ao grupo STZ ($n = 7$).

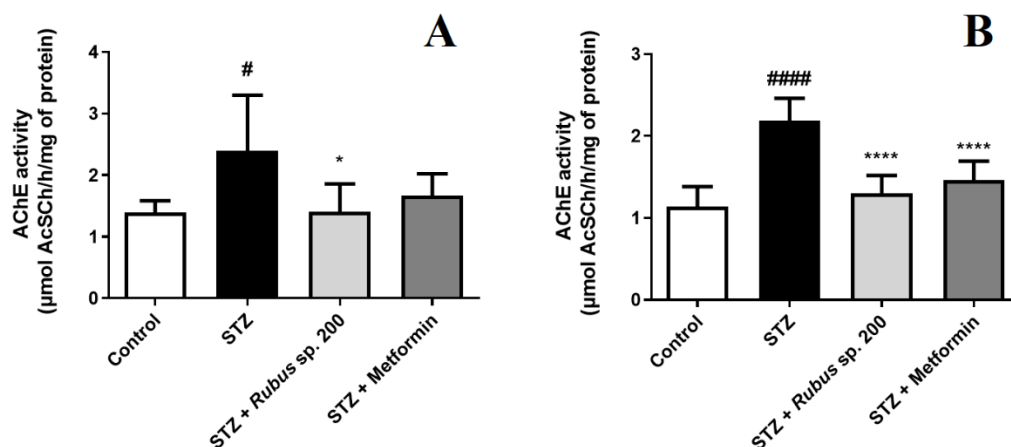


Figura 4: Efeitos do extrato de *Rubus* sp. (200 mg/kg) e metformina (150 mg/kg) na atividade da acetilcolinesterase (AChE) no córtex cerebral (A) e cerebelo (B) córtex cerebral de ratos submetidos a um modelo de demência esporádica induzida por STZ (3 mg/kg). Os dados são expressos como a média $\pm$ S.E.M. # $P < 0,05$ e ##### $P < 0,0005$ em comparação com o grupo controle. * $P < 0,05$ e **** $P < 0,0005$ em comparação com o grupo STZ ($n = 7$).

5. DISCUSSÃO

A DA é uma doença altamente incapacitante e é um dos grandes problemas de saúde pública, uma vez que não existe cura e os tratamentos disponíveis apenas retardam alguns dos sintomas. Ainda, uma vez que os tratamentos apenas amenizam os sintomas da doença, os indivíduos com DA passam a necessitar de internações e de tratamentos paliativos que desprendem altos gastos dos cofres públicos (INSTITUTO DO ALZHEIMER BRASIL, 2021; SHI *et al.*, 2022).

A DA é uma doença multifatorial, desta forma, terapias multialvos podem ser de grande impacto no tratamento da doença. Frutos vermelhos são caracterizados por terem uma grande concentração de antocianinas, dentre estes pode-se destacar o mirtilo, morango, ameixa, uva, araçá e a amora. Esses frutos são facilmente distribuídos no país, principalmente no estado do Rio Grande do Sul, entretanto, seus potenciais farmacológicos e sua composição química ainda são pouco explorados (DAUBENY, 1996; ANTUNES; PERES, 2013; ANTUNES; RASSEIRA, 2004).

Neste sentido, Chaves *et al.*, 2018, realizou a caracterização da composição de antocianinas e a avaliação do perfil biológico de diversos frutos nativos do Rio Grande do Sul, que apresentavam cor avermelhada e roxa. A amora preta destacou-se por apresentar altas concentrações de numerosas antocianinas e ser promissora na atividade biológica atuando como antioxidante (CHAVES *et al.*, 2018). Nesta tese, foi possível comprovar o potencial antioxidante da amora *in vitro*, bem como, em diferentes modelos pré-clínicos da DA. Assim, foi possível observar que a amora preta possui ações cerebrais multialvo, uma vez que modula também a sinalização colinérgica, inflamação e a expressão gênica de fatores de transcrição que modulam diversas funções celulares. Esses efeitos do extrato em diferentes alvos podem estar associados à melhora da memória, observada nos modelos experimentais. Cabe mencionar que estes são os primeiros estudos que avaliaram o extrato de *Rubus* sp. em mecanismos associados ao desenvolvimento e a progressão da DA.

Trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa já demonstraram que a amora preta também possui ação neuroprotetora e antioxidante em modelos de mania e neuroinflamação (SPOHR *et al.*, 2018; SOARES *et al.*, 2021). Neste contexto, o objetivo do capítulo 1 foi avaliar o efeito do extrato de *Rubus* sp. em

um modelo experimental de amnésia induzido por SCO. Os resultados demonstraram que a SCO induziu déficit de memória associado a um aumento de estresse oxidativo e alterações na enzima AChE. O extrato de amora preta foi capaz de prevenir estas alterações de modo similar ao donepezil, um fármaco com ação anticolinesterásica, usado no tratamento da DA.

Cabe destacar que o extrato de *Rubus* sp. no modelo de amnésia modulou a atividade da AChE em diferentes estruturas cerebrais. Neste trabalho, além de córtex cerebral e hipocampo, também foi avaliado o cerebelo. Embora o cerebelo não seja uma das estruturas mais avaliadas na DA, nossos achados demonstraram alterações na AChE em cerebelo sugerindo que disfunções nesta região cerebral pode contribuir com a progressão da doença ou ainda, se tornar uma consequência de outros eventos patológicos que ocorrem em estruturas cerebrais distintas (SCHMAHMANN, 2016). Com a progressão da DA, observa-se que os pacientes passam a desenvolver problemas na marcha, equilíbrio e coordenação dos membros, e consequentemente déficits na cognição, emoção e planejamento, sugerindo uma implicação no processamento da informação e variabilidade nas sequências de aprendizagem (BAUMANN *et al.*, 2015). Sugere-se que os déficits cognitivos relacionados ao cerebelo são modulados em fases iniciais da DA, uma vez que foi visto que algumas tarefas afetadas em pacientes que apresentam lesão cerebelar também são vistas nos estágios iniciais da DA (BAUMANN *et al.*, 2015; LEGGIO; MOLINARI, 2015).

Neste trabalho avaliou-se também os efeitos do extrato de *Rubus* sp. e metformina em um modelo experimental de DA induzido por STZ. Este modelo tem sido bem aceito na literatura uma vez que é capaz de mimetizar mais fielmente as alterações cerebrais encontradas na DA, como anormalidades mitocondriais, estresse oxidativo, déficit no metabolismo de glicose cerebral, neuroinflamação, acúmulo do peptídeo β -amilóide, disfunção colinérgica e danos na aprendizagem e memória (RAVELLI *et al.*, 2017). Neste protocolo, os animais foram tratados por 21 dias com extrato de *Rubus* sp. e metformina e os testes de memória realizados no final do experimento. As alterações bioquímicas e moleculares foram avaliadas em diferentes regiões cerebrais como hipocampo, córtex cerebral e cerebelo.

Com relação aos resultados demonstrados no Capítulo 2, foi possível demonstrar que o STZ induziu déficits de memória nos animais, corroborando com

os resultados de outros estudos (GUTIERRES et al. 2014; TEIXEIRA et al., 2020; PILIPENKO et al., 2020). O extrato de *Rubus* sp. foi capaz de reverter os danos na memória induzidos pelo STZ. Um dos possíveis mecanismos envolvidos neste efeito pode ser atribuído a modulação da atividade da AChE pelo extrato, uma vez que o sistema colinérgico desempenha um papel central na regulação da aprendizagem e da memória.

Além disso, a STZ altera o metabolismo da glicose no cérebro e induz a dessensibilização dos receptores de insulina cerebrais (PILIPENKO et al., 2020). Desta forma, neste trabalho, avaliou-se a expressão gênica dos receptores de insulina e de vias de sinalização de insulina em hipocampo para corroborar com alguns resultados já obtidos por outros pesquisadores, bem como para investigar o papel da metformina e do extrato de *Rubus* sp. frente a hipótese de resistência à insulina relacionado com o déficit de memória. Apesar de não observarmos resultados referentes ao uso do extrato de amora preta, quando comparado ao grupo STZ, pode-se concluir que o extrato modulou a expressão gênica quando comparado ao grupo controle.

Além disso, como visto no Capítulo 2 e 3, o tratamento com extrato de *Rubus* sp. foi capaz de proteger contra o dano oxidativo causado pelo STZ, sugerindo que esse efeito pode estar associado à melhora da memória, corroborando com estudos do nosso grupo de pesquisa que investigaram o efeito de um extrato rico em antocianinas (GUTIERREZ et al., 2014; PACHECO et al., 2018). Sendo assim, pode-se concluir que a extração metanólica realizada a partir do fruto de amora preta foi eficaz de reduzir o dano oxidativo do STZ em cérebro de ratos. Cabe salientar que as antocianinas são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, e atuar em várias regiões do cérebro, incluindo regiões relacionadas à memória e aprendizagem, como o córtex, o hipocampo e o cerebelo.

Por fim, o extrato de amora preta foi capaz de atenuar danos cerebrais em ambos os protocolos realizados, de modo similar aos fármacos donepezil e metformina. O extrato de amora preta demonstrou ter uma ação multialvo sendo capaz de modular importantes mecanismos associados ao desenvolvimento e a progressão da DA como estresse oxidativo, sinalização colinérgica, inflamação, p-Tau fosforilada e sinalização da insulina. Assim, nossos resultados sugerem

que o potencial terapêutico da amora preta pode ser promissor para o tratamento da DA.

6. CONCLUSÕES

O pré tratamento com extrato de amora preta foi capaz de prevenir os déficits de memória induzidos por SCO. Ainda, os resultados da presente tese demonstraram que o tratamento com extrato de amora preta, após a indução do modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer, também reverteu o déficit de memória induzido pela administração intracerebroventricular de STZ em ratos. Esses efeitos neuroprotetores do extrato de amora podem ser associados a diminuição do dano oxidativo, neuroinflamação, melhora na sinalização colinérgica e modulação da expressão gênica de GSK3 β em regiões cerebrais como córtex, hipocampo e cerebelo.

Esses dados visam contribuir na busca de novas alternativas terapêuticas coadjuvantes para o tratamento de doenças que acometem o SNC, principalmente aquelas que apresentam déficit de memória, como a DA. Ademais, é válido destacar que estes são os primeiros resultados da literatura que investigam o potencial do extrato de *Rubus* sp. em modelos experimentais da DA. Sendo assim, os resultados desta tese corroboram com outros estudos que avaliam o potencial de frutos ricos em antocianinas na prevenção de doenças neurológicas que apresentam como características principais o dano oxidativo e os déficits de memória.

Diante do exposto, é possível concluir que o extrato de *Rubus* sp. é um agente natural multialvo, e que apresenta propriedades neuroprotetoras capazes de amenizar e modular mecanismos associados a DA. A capacidade dos compostos bioativos do extrato de amora em modular as vias envolvidas na neurodegeneração, com relativa segurança e baixa toxicidade, garante seu potencial como alvo terapêutico para estudos clínicos posteriores na DA.

7. PERSPECTIVAS

Neste trabalho de tese foram apresentados os resultados referentes à avaliação do extrato de *Rubus* sp. em dois modelos animais da DA, sendo um deles de amnésia e o outro à doença esporádica do tipo Alzheimer. Com relação aos dados do modelo de amnésia induzido por SCO, os resultados já estão finalizados e publicados em periódico indexado. Entretanto, com relação ao modelo de doença esporádica do tipo Alzheimer, induzido por STZ, está sendo redigido um segundo manuscrito, nos quais alguns dos resultados parciais concluídos até o momento foram apresentados nesta tese. Neste próximo trabalho, buscamos compreender como o extrato de amora preta, bem como a metformina, desenvolvem sua atividade em córtex e cerebelo. Ainda, buscamos avaliar em hipocampo e córtex outros marcadores de expressão gênica que sejam mais relacionados com a DA, como a expressão da p-Tau e da β -amilóide, bem como da bomba de íons e fatores neurotróficos.

8. REFERÊNCIAS

- AA. Alzheimer's Association. Disponível em: www.alz.org. Acessado em 29/01/2023.
- AFZAL, M.; REDHA, A.; ALHASAN, R. Anthocyanins Potentially Contribute to Defense against Alzheimer's Disease. **Molecules**. v.24, p.42-55, 2019.
- AHMADIAN, G.; JU, W.; LIU, L.; WYSZYNSKI, M.; LEE, S.H.; DUNAH, A.W. Tyrosine phosphorylation of GluR2 is required for insulin-stimulated AMPA receptor endocytosis and LTD. **The Embo Journal**. v.23, p.1040–50, 2004.
- AIR, E.L.; BENOIT, S.C.; CLEGG, D.J.; SEELEY, R.J.; WOODS, S.C. Insulin and Leptin Combine Additively to Reduce Food Intake and Body Weight in Rats. **Endocrinology**. v.143, p.2449-2452, 2002.
- AKSOZ, E.; GOCMEZB, S.S.; SAHINB, T.D.; AKSITC, D.; AKSITD, H.; UTKAN, T. The protective effect of metformin in scopolamine-induced learning and memory impairment in rats. **Pharmacological Reports**. v.71, p.818–825, 2019.
- AL HAJ AHMAD R.M. Thinking about Brain Insulin Resistance. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**. v.12, p.1091-1094, 2018.
- ANSOLEAGA, B.; JOVÉ, M.; SCLUTER, A.; GARCIA-ESPARCIA, P.; MORENO, J.; PUJOL, A.; PAMPLONA, R.; PORTERO-OTIN, M.; FERRER, I. Deregulation of purine metabolism in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**. v.36. p.68–80, 2015.
- ANTUNES, L.E.C.; PERES, N.A. Strawberry Production in Brazil and South America. **International Journal of Fruit Science**. v.13, p.156- 161, 2013.
- ANTUNES, L.E.C.; RASSEIRA, M. Aspectos técnicos da cultura da amora-preta: Embrapa Clima Temperado, 2004.
- ATRI, A. Current and Future Treatments in Alzheimer's Disease. **Seminars in Neurology**. v.39, p.227–240, 2019.
- BASU, A.; DU, M.; LEYVA, M.J.; SANCHEZ K.; BETTS N.M.; WU M.; ASTON, C. E.; LYONS, T. J. Blueberries decrease cardiovascular risk factors in obese men and women with metabolic syndrome. **Journal of Nutrition**. v.140, p.1582-1587, 2010.
- BAUMANN, O.; BORRA, R.J.; BOWER, J.M.; CULLEN, K.E.; HABAS, C.; IVRY, R.B. Consensus paper: the role of the cerebellum in perceptual processes. **Cerebellum**. v.14, p.197–220, 2015.

BELOOSESKY, Y.; SALMAN, H.; BERGMAN, M.; BESSLER, H.; & DJALDETTI, M. Cytokine Levels and Phagocytic Activity in Patients with Alzheimer's Disease. **Gerontology**. v.48, p.128–132, 2002.

BELOOSESKY, Y.; SALMAN, H.; BERGMAN, M.; BESSLER, H.; DJALDETTI, M. Cytokine levels and phagocytic activity in patients with Alzheimer's disease. **Gerontology**. V.48, p.128-32, 2002.

BLAZQUEZ, E.; VELAZQUEZ, E.; HURTADO-CARNEIRO, V.; AND RUIZ-ALBUSAC, J.M. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. **Frontiers in Endocrinology**. v.5, p.161, 2014.

BÓ, C.D.; MARTINI, D.; PORRINI, M.; KLIMIS-ZACASC, D.; RISO, P. Berries and oxidative stress markers: an overview of human intervention studies. **Food and Function**. v.6, p.2890–2917, 2015.

BRIGGS, R.; KENNELLY, S.P.; O'NEILL, D. Drug Treatments in Alzheimer's Disease. **Clinical Medicine**. v.16, p.247–253, 2016.

BURTON-FREEMAN, B.; LINARES, A.; HYSON, D.; KAPPAGODA, T. Strawberry modulates LDL oxidation and postprandial lipemia in response to high-fat meal in overweight hyperlipidemic men and women. **Journal of the American College of Nutrition**. v.29, p.46-54, 2010.

CAMPBELL, J.M., STEPHENSON, M.D., COURTEN, B., CHAPMAND, I., BELLMAN, S.M., AROMATARIS, E. Metformin Use Associated with Reduced Risk of Dementia in Patients with Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Alzheimer's Disease**. v.65, p.1225–1236, 2018.

CARDOSO, J.S.; OLIVEIRA, P.S.; BONA, N.P.; VASCONCELLOS, F.A.; BALDISSARELLI, J.; VIZZOTTO, M.; SOARES, M.S.P.; RAMOS, V.P.; SPANEVELLO, R.M.; LENCINA, C.L.; TAVARES, R.G.; STEFANELLO, F. M. Antioxidant, antihyperglycemic, and antidyslipidemic effects of Brazilian-native fruit extracts in an animal model of insulin resistance. **Redox Report**. v.23, p.41–46, 2017.

CARVALHO, A.; BLUM-SILVA, C. H.; CALVETE, E., REGINATTO, F.H.; SIMÕES, C. Anti HSV-1 activity of five strawberry cultivars. **Latin American Journal of Pharmacy**. v.31, p.133-137, 2012.

CARVALHO, F. B.; GUTIERRES, J. M.; BUENO, A.; AGOSTINHO, P.; ZAGO, A. M.; VIEIRA, J.; FRÜHAUF, P.; CECHELLA, J. L.; NOGUEIRA, C. W.; OLIVEIRA, S. M.; RIZZI, C.; SPANEVELLO, R. M.; DUARTE, M. M. F.; DUARTE, T.; DELLAGOSTIN, O. A.; ANDRADE, C. M. Anthocyanins control neuroinflammation and consequent memory dysfunction in mice exposed to lipopolysaccharide. **Molecular Neurobiology**. v.54, p.3350-3367, 2016.

CHAKRABORTY, A.; DIWAN, A. Alzheimer and It's Possible Therapy: A Review. **Journal of Experimental Neurology**. v.1, p.115–122, 2020.

CHAVATTE-PALMER, P., TARRADE, A., ROUSSEAU-RALLIARD, D. Diet before and during pregnancy and offspring health: The importance of animal models and what can be learned from them. International. **Journal of Environmental Research and Public Health**. v.6, p.1-6, 2016.

CHAVES, V.C.; BOFF, L.; VIZZOTTO, M.; CALVETE, E.; REGINATTO, F.H.; SIMÕES, C.M.O. Berries grown in brazil: Anthocyanins Profiles and biological properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 98, p.4331-4338, 2018.

CHAVES, V.C.; SOARES, M.S.P.; SPOHR, L.; TEIXEIRA, F.; VIEIRA, A.; CONSTANTINO, L.S.; PIZZOL, F.D.; LENCINA, C.L.; SPANEVELLO, R.M.; FREITAS, M.P.; SIMÕES, C.M.O.; REGINATTO, F.H.; STEFANELLO, F.M. Blackberry extract improves behavioral and neurochemical dysfunctions in a ketamine-induced rat model of mania. **Neuroscience Letters**. v.1, p.714, 2020.

CHEN, Y.G. Research Progress in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Chinese Medical Journal**. v.131, p.1618–1624, 2018.

ÇOBAN, E.P.; BIYIK, H. Antimicrobial activity of the ethanol extracts of some plants natural growing in Aydin, Turkey. **African Journal of Microbiology Research**. v.4, p.2318-2323, 2010.

CORREIA, S.C.; SANTOS, R.X.; PERRY, G.; ZHU, X.; MOREIRA, P.I.; SMITH, M.A. Insulin-Resistant Brain State: the culprit in sporadic Alzheimer's Disease? **Ageing Research Review**. v.10, p.264–273, 2011.

CREWS, L.; MASLIAH, E. Molecular mechanisms of neurodegenerations in Alzheimer's disease. **Human Molecular Genetics**. v.19, p.12-20, 2010.

D'ANNA, L.; ABU-RUMEILEH, S.; FABRIS, M.; PISTIS, C.; BALDI, A.; SANVILLI, N.; CURCIO, F.; GIGLI, G.L.; D'ANNA, S.; VALENTE, M. Serum Interleukin-10 Levels Correlate with Cerebrospinal Fluid Amyloid Beta Deposition in Alzheimer Disease Patients. **Neurodegenerative Diseases**. v.17, p.227–234, 2017.

DAUBENY, H. Brambles. **Fruit breeding**. v.2, p.109-190, 1996.

DE LA TORRE, J.C. Pathophysiology of neuronal energy crisis in Alzheimer's disease. **Neurodegenerative Disease**. v.5, p.126-132, 2008.

DE SOUZA, V.R.; PEREIRA, P.A.P.; SILVA, T.L.T.; LIMA, L.C.O.; PIO, R.; QUEIROZ, F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry**. v.156, p.362–368, 2014.

DENARDIN, C.C.; HIRSCH, G.E.; DA ROCHA, R.F. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**. v.23, p.387-398, 2015.

DMS-5. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mental. 5ª edição. 2014.

DONALD, K.I.; SPANGLER, E.L.; GREIG, N.H.; LONDON, E.D. Rodent models of memory dysfunction in Alzheimer's Disease and normal aging: Moving beyond the cholinergic hypothesis. **Life sciences**. v.55, p.2037-2043, 1994.

FDA. Food and Drug Administration. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/postmarket-drug-safety-information-patients-and-providers/aducanumab-marketed-aduhelm-information>. Acessado em: 13/02/2023.

FDA. Food and Drug Administration. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-grants-accelerated-approval-alzheimers-disease-treatment>. Acessado em: 13/02/2023.

FERNANDEZ, A.M.; TORRES-ALEMAN, I. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. **Nature Reviews Neuroscience**. v.13, p.225-239, 2012.

FERREIRA-VIEIRA, T.; GUIMARAES, I.M.; SILVA, F.R.; RIBEIRO, F.M. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. **Curr Neuropharmacology**. v.14, p.101-115, 2016.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**. v.408, p.239-247, 2000.

FOLMER, F.; BASAVARAJU, U.; JASPARS, M. Anticancer effects of bioactive berry compounds. **Phytochemistry Reviews**. v.13, p.295- 322, 2014.

FORRESTER, S.J.; KIKUCHI, D.S.; HERNANDES, M.S.; XU, Q.; GRIENDLING, K.K. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. **Circulation Research**. v.122, p.877-902, 2018.

FOUDA, A.Y.; Kozak, A.; Alhusban, A.; Switzer, J.A.; Fagan, S.C. Anti-inflammatory IL-10 is upregulated in both hemispheres after experimental ischemic stroke: Hypertension blunts the response. **Experimental & Translational Stroke Medicine**. v.5, p.1-12, 2013.

GAZAL, M.; KAUFMANN, F.N.; ACOSTA, B.A.; OLIVEIRA, P.S.; VALENTE, M.R.; ORTMANN, C.F.; STURBELLE, R.; LENCINA, C.L.; STEFANELLO, F.M.; KASTER, M.P.; REGINATTO, F.H.; GHISLENI, G. Preventive effect of *Cecropia pachystachya* against ketamine-induced manic behavior and oxidative stress in rats. **Neurochemical Research**. v.40, p.1421-1430, 2015.

GHASEMI R, HAERI A, DARGAHI L, MOHAMED Z, AHMADIANI A. Insulin in the brain: Sources, localization and functions. **Molecular Neurobiology**. v.47, p.145–171, 2013.

GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M.G. A Century of Alzheimer's Disease. **Science**. v.341, p.777-781, 2012.

GRAY, S.C.; KINGHORN, K.J.; WOODLING, N.S. Shifting equilibriums in Alzheimer's disease: The complex roles of microglia in neuroinflammation, neuronal survival and neurogenesis. **Neural Regeneration Research**. v.15, p.1208, 2020.

GUO, J.; YU, C.; LI, H.; LIU, F.; FENG, R.; WANG, H.; MENG, Y.; LI, Z.; JU, G.; WANG, J. Impaired neural stem/progenitor cell proliferation in streptozotocin-induced and spontaneous diabetic mice. **Neuroscience Research**. v.68, p. 329-336, 2010.

GUPTA, A.; BISHT, B.; SANKAR, C.D. Peripheral insulin-sensitizer drug metformin ameliorates neuronal insulin resistance and Alzheimer's-like changes. **Neuropharmacology**. v.60, p.910-920, 2011.

GUTIERRES, J.M.; CARVALHO, F.B.; SCHETINGER, M.R.; RODRIGUES, M.V.; SCHMATZ, R.; PIMENTEL, V.C.; VIEIRA, J.M.; ROSA, J.M.; MARISCO, P.; RIBEIRO, D.A.; LEAL, C.; RUBIN, M.A.; MAZZANTI, C.M.; SPANEVELLO, R. Protective effects of anthocyanins on the ectonucleotidase activity in the impairment of memory induced by scopolamine in adult rats. **Life Sciences**. v.91, p.1221–1228, 2012.

GUTIERRES, J.M.; CARVALHO, F.B.; SCHETINGER, P.C.; MARISCO, P.; AGOSTINHO, P.; RODRIGUES, M.; RUBIN, M.A.; SCHMATZ, R.; DA SILVA, C.R.; COGNATO, G.P.; FARIAS, J.G.; SIGNOR, C.; MORSCH, V.M.; MAZZANTI, C.M.; BOGO, M.; BONAN, C.D.; SPANEVELLO, R. Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. **Life Science**. v.96. p.7-17. 2014.

HAASS, C.; SELKOE, D.J. Soluble Protein Oligomers in Neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's Amyloid β -Peptide. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v.8, p.101–112, 2007.

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

HAMPEL, H.M.; MESULAM, M.; CUELLO, A.C.; FARLOW, M.R.; GROSSBERG, G.T.; KHACHATURIAN, A.S.; ERGALLO, A.; CAVEDO, E.; SNYDER, P.J.; KHACHATURIAN, Z.S. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. **Brain**. v.141, p.1917–1933, 2018.

HAYES, J.D.; MCLELLAN, L.I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. **Free Radical Research**. v.31, p.273-300, 1999.

HE, J.; GIUSTI, M. Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. **Annual Review of Food Science and Technology**. v.1, p.163-187, 2010.

HEPPNER, F.L.; RANSOHOFF, R.M.; BECHER, B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**. v.16, p.358-372, 2015.

HIPPIUS, H.; NEUNDORFER, G. The Discovery of Alzheimer's disease. **Dialogues Clinical Neuroscience**. v.5, p.101-108, 2003.

HIRSCH, G.E.; FACCO, E.M.P.; RODRIGUES, D.B.; VIZOTTO, M.; EMANUELLI, T. Caracterização físico-química de variedades de amora preta da região sul do Brasil. **Ciência Rural**. v. 42, p. 942–947, 2012.

IAB. Instituto Alzheimer do Brasil. Disponível em: <https://www.institutoalzheimerbrasil.org.br/>. Acessado em 29/01/2023.

IZQUIERDO, I. et al. Pharmacological Findings on the Biochemical Bases of Memory Processes. **Neural Plasticity**. v.11. p.159–190, 2004.

KAMAT, P.K.; RAI, S., SWARNKAR, S., SHUKLA, R., & NATH, C. Mechanism of synapse redox stress in Okadaic acid (ICV) induced memory impairment: Role of NMDA receptor. **Neurochemistry International**. v.76, p.32–41, 2014.

KANDIMALLA R.; THIRUMALA V.; REDDY, P.H. Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1863, p.1078–1089, 2017.

KAISTER, M.P.; REGINATTO, F.H.; GHISLENI, G. Preventive Effect of Cecropia pachystachya Against Ketamine-Induced Manic Behavior and Oxidative Stress in Rats. **Neurochemical Research**. v.40, p.1421–1430, 2015.

KESHAVARZI, S.; KERMANSHAH, S.; KARAMI, L.; MOTAGHINEJAD, M., MOTEVALIAN, M.; SADR, S. Protective role of metformin against methamphetamine induced anxiety, depression, cognition impairment and neurodegeneration in rat: The role of CREB/BDNF and Akt/GSK3 signaling pathways. **Neurotoxicology**. v.72, p.74-84, 2019.

KIM H.G.; JU M.S.; SHIM J.S.; KIM M.C.; LEE S.H.; HUH Y. Mulberry fruit protects dopaminergic neurons in toxin-induced Parkinson's disease models. **British Journal of Nutrition**. v.104, p.8-16, 2010.

KNEZOVIC, A.; OSMANOVIC-BARILAR, J.; CURLIN, M.; HOF, P.R.; SIMIC, G.; RIEDERER, P.; SALKOVIC-PETRISIC, M. Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. **Journal Neural Transmission**. v.122, p.577–592, 2015.

KOO, B.K.; KIM, L.K.; LEE, J.Y.; MOON, M.K. Taking metformin and cognitive function change in older patients with diabetes. **Geriatrics & Gerontology International**. p.1-7, 2019.

KOUKOULI, F.; CHANGEUX, J.P. Do Nicotinic Receptors Modulate High-Order Cognitive Processing?. **Cell Press**. v.43, P.550-564, 2020.

KUMAR K.; KUMAR A.; KEEGAN R.M.; DESHMUKH, R. Recent advances in the neurobiology and neuropharmacology of Alzheimer's disease. **Biomedicine & pharmacotherapy**. v.98, p.297-307, 2018.

LATTA, C.; BROTHERS, H.; WILCOCK, D. Neuroinflammation in Alzheimer's disease; a source of heterogeneity and target for personalized therapy. **Neuroscience**. v.27, p.103-111, 2014.

LEE, C.C.; HUANG, C.C.; HSU, K.S. Insulin promotes dendritic spine and synapse formation by the PI3K/Akt/mTOR and Rac1 signaling pathways. **Neuropharmacology**. v.61, p.867-879, 2011.

LEGGIO, M.; MOLINARI, M. Cerebellar sequencing: a trick for predicting the future. **Cerebellum**. v.14, p.35-48, 2015.

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.

LIU, Y.; ZHANG, X.J.; YANG, C.H.; FAN, H.G. Oxymatrine protects rat brains against permanent focal ischemia and downregulates NF-kappaB expression. **Brain Research**. v.1268, p.174 - 180, 2009.

LJUBISAVLJEVIC, S. Oxidative Stress and Neurobiology of Demyelination. **Molecular Neurobiology**. v.53, p. 744-758, 2016.

LLANO, D.A.; LI, J., WARING, J.F.; ELLIS, T.; DEVANARAYAN, V.; WITTE, D. G.; LENZ, R.A. Cerebrospinal Fluid Cytokine Dynamics Differ Between Alzheimer Disease Patients and Elderly Controls. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**. v.26, p.322–328, 2012.

LLORENS-MARTÍN, M.; TORRES-ALEMÁN, I.; TREJO, J.L. Reviews: mechanisms mediating brain plasticity. **The Neuroscientist**. v.15, p.134- 148, 2009.

MACHADO, A.P.D.F.; PASQUEL-REATEGUI, J.L.; BARBERO, G.F.; MARTINEZ, J. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: A comparison with conventional methods. **Food Research International**. v.77, p.675–683, 2015.

MAN, H.Y.; LIN, J.W.; JU, W.H.; AHMADIAN, G.; LIU, L.; BECKER, L.E.; SHENG, M.; WANG, Y.T. Regulation of AMPA Receptor–Mediated Synaptic Transmission by Clathrin-Dependent Receptor Internalization. **Neuron**. v.25, p.649-662, 2000.

MARCUS, D.L.; THOMAS C.; RODRIGUEZ, C.; SIMBERKOFF, K.; TSAI, J.S.; STRAFACI, J.A.; FREEDMAN, M.L.; Increased Peroxidation and Reduced Antioxidant Enzyme Activity in Alzheimer's Disease. **Experimental neurology**. v.150, p.40–44, 1998.

MARKOWICZ-PIASECKA M.; SIKORA J.; MATEUSIAK L.; MIKICIUK-OLASIK E.; HUTTUNEN K.M. Metformin and Its Sulfenamide Prodrugs Inhibit Human Cholinesterase Activity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v.2017, p.1-11, 2017.

MCNAY, E.C.; ONG, C.T.; MCCRIMMON, R.J.; CRESSWELL, J.; BOGAN, J.S.; SHERWIN, R.S. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. **Neurobiology of Learning and Memory**. v.93, p.546-553, 2010.

MIN J., YU S.W., BAEK S.H., NAIR K.M., BAE O.N., BHATT A. Neuroprotective effect of cyanidin-3-O-glucoside anthocyanin in mice with focal cerebral ischemia **Neuroscience Letters**. v.500, p.157–161, 2011.

MISHRA, S.K.; SINGH, S.; SHUKLA, S.; SHUKLA, R. Intracerebroventricular streptozotocin impairs adult neurogenesis and cognitive functions via regulating neuroinflammation and insulin signaling in adult rats. **Neurochemistry International**. v.113, p.56–68, 2018.

MOTA, R.V. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DE GELÉIA DE AMORA PRETA. **Ciência Tecnologia Alimentos**. v.26, p.539-543, 2006.

MUKHOPADHYAY, S.; BANERJEE, D. A Primer on the Evolution of Aducanumab: The First Antibody Approved for Treatment of Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimers Disease**. v.83, p.1537-1552, 2021.

MULLER, A. P.; FERNANDEZ, A. M.; HAAS, C.; ZIMMER, E.; PORTELA, L. V.; TORRES-ALEMAN, I. Reduced brain insulin-like growth factor I function during aging. **Molecular and Cellular Neuroscience**. v.49, p.9-12, 2012.

NASRI, S.; ROGHANI, M.; BALUCHNEJADMOJARAD, T.; BALVARDI, M.; RABANI, T. Chronic Cyanidin-3-glucoside Administration Improves Short-term

Spatial Recognition Memory but not Passive Avoidance Learning and Memory in Streptozotocin-diabetic Rats. **Phytotherapy Research**. v.26, p.1-6, 2012.

OLIVEIRA, P.; CHAVES, V.; SOARES, M.S.P.; BONA, N.P.; MENDONÇA, L.T.; CARVALHO, F.B.; GUTIERRES, J.M.; VASCONCELLOS, F.; VIZZOTTO, M.; VIEIRA, A.; SPANEVELLO, R.M.; REGINATTO, F.H.; LENCINA, C.L.; STEFANELLO, F.M. Southern Brazilian native fruit shows neurochemical, metabolic and behavioral benefits in an animal model of metabolic syndrome. **Metabolic Brain Disease**. v.33, p.1551-1562, 2018.

PACHECO, S.M.; SOARES, M.S.P.; GUTIERRES, J.M.; GERZSON, M.F.B.; CARVALHO, F.B.; AZAMBUJA, J.H.; SCHETINGER, M.R.C.; STEFANELLO, F.M.; SPANEVELLO, R.M. Anthocyanins as a potential pharmacological agent to manage memory deficit, oxidative stress and alterations in ion pump activity induced by experimental sporadic dementia of Alzheimer's type. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. v.56, p.193-204, 2018.

PASSERI, E.; ELKHOURY, K.; MORSINK, M.; BROERSEN, K.; LINDER, M.; TAMAYOL, A.; MALAPLATE, C.; YEN, F.T.; ARAB-TEHRANY, E. Alzheimer's disease: treatment strategies and their limitations. **International Journal of Molecular Sciences**. v.23, p.13954, 2022.

PATTERSON, C., FEIGHTNER, J.D., GARCIA, A., HSIUNG, G.Y.R., MACKNIGHT, C., SADOVNICK, A.D. Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease. *Canadian Medical Association Journal*. v.178, p.548-556, 2008.

PEREZ-ASENSIO, F.J.; Perpiñá, U.; Planas, A.M.; Pozas, E. Interleukin-10 regulates progenitor differentiation and modulates neurogenesis in adult brain. **Journal of Cell Science**. v.126, p.4208-4219, 2013.

PILIPENKO V.; NARBUTE K.; PUPURE J.; LANGRATE I.K.; MUCENIECE R.; KLUŠA V. Neuroprotective potential of antihyperglycemic drug metformin in streptozocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmacology**. v.881, p.1-49, 2020.

POMILIO, C.; PÉREZ, N.G.; CALANDRI, I.; CRIVELLI, L.; ALLEGRI, R.; SEVLEVER, G.; SARAIVA, F. Diabetic patients treated with metformin during early stages of Alzheimer's disease show a better integral performance: data from ADNI study. **Geroscience**. v.44, p.1791-1805, 2022.

POOLE, L.B. The Basics of Thiols and Cysteines in Redox Biology and Chemistry. **Free Radical Biology Medicine**. p.148-57, 2015.

PUERTAS, M.C.; MARTÍNEZ-MARTOS, J.M.; COBO, M.P.; CARRERA, M.P.; MAYAS, M.D.; RAMÍREZ-EXPÓSITO, M.J. Plasma oxidative stress parameters

in men and women with early stage Alzheimer type dementia. **Experimental Gerontology**. v.47, p.625-630, 2012.

RAVELLI, K.G., ROSÁRIO, B.A., CAMARINI, R., HERNANDES, M.S., BRITTO, L.R. Intracerebroventricular Streptozotocin as a Model of Alzheimer's Disease: Neurochemical and behavioral characterization in mice. **Neurotoxicity Research**. v.31, p.327-333, 2017.

REVETT, T.J.; BAKER, G.B.; JHAMANDAS, J.; KAR, S. Glutamate system, amyloid (beta) peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**. v.38, p.6-23, 2013.

RUBIO-PEREZ, J.; MORILLAS-RUIZ, J.M. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. **Scientific World Journal**. v.2012, p.1-16, 2012.

SALAMA, A.F.; Tousson, E.; Ibrahim, W.; Hussein, W.H. Biochemical and histopathological studies of the PTU-induced hypothyroid rat kidney with reference to the ameliorating role of folic acid. **Toxicology and Industrial Health**. v.29, p.600-8, 2012.

SASTRE, M., WALTER, J., GENTLEMAN, S.M. Interactions between APP secretases and inflammatory mediators. **Journal Neuroinflammation**. v.5 p.1-25, 2008.

SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission**. v.113, p.1625-44, 2006.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.; KREWER, G.; Phenolic compounds and antioxidant capacity of georgia-grown blueberries and blackberries. **Journal of agricultural and Food Chemistry**. v.50, p.2432-2438, 2002.

SHI, M.; CHU, F.; ZHU, F.; ZHU, J. Impact of Anti-amyloid- β Monoclonal Antibodies on the Pathology and Clinical Profile of Alzheimer's Disease: A Focus on Aducanumab and Lecanemab. **Frontiers in Aging Neuroscience**. v.12; p.870517, 2022.

SHONESYA, B.C.; THIRUCHELVAMA, K.; PARAMESHWARANA, K.; RAHMANA, E.A.; KARUPPAGOUNDERA, S.S.; HUGGINSB, K.W.; PINKERTC, C.A.; AMINA, R.; DHANASEKARANA, M.; SUPPIRAMANIAM, V. Central insulin resistance and synaptic dysfunction in intracerebroventricular-streptozotocin injected rodents. **Neurobiology of Aging**. v.33, p.5-18, 2012.

SCHMAHMANN, J.D. Cerebellum in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia: not a silent bystander. **Brain**. v.139, p.1314–1318, 2016.

SIRIWOAHNRN T.; WROLSTAD, R.E.; FINN, C. E.; PEREIRA, C.B. Influence of cultivar, maturity and sampling on blackberry: Anthocyanins, Polyphenol and antioxidante properties. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v.52, p.8021-8030, 2004.

SOARES, M.S.P.; LUDUVICO, K.P.L; CHAVES, V.C.; SPOHR, L.; MEINE, B.M.; LENCINA, C.L.; REGINATTO, F.H.; SPANEVELLO, R.M.; SIMÕES, C.M.O.; STEFANELLO, F.M. The Protective Action of *Rubus* sp. Fruit Extract Against Oxidative Damage in Mice Exposed to Lipopolysaccharide. **Neurochemical Research**. v.46, p.1129–1140, 2021.

SPOHR, L.; LUDUVICO, K.P.; SOARES, M.S.P.; BONA, N.P.; OLIVEIRA, P.S.; MELLO, J.E.; ALVEZ, F.L.; TEIXEIRA, F.C.; FELIX, A.O.C.; STEFANELLO, F.M.; SPANEVELLO, R.M. Blueberry extract as a potential pharmacological tool for preventing depressive-like behavior and neurochemical dysfunctions in mice exposed to lipopolysaccharide. **Nutritional Neuroscience**. v.21, p.1-14, 2020.

SPOHR, L.; SOARES, M.S.P.; OLIVEIRA, P.S.; MATTOS, B.S.; BONA, N.P.; PEDRA, N.S.; TEIXEIRA, F.C.; COUTO, C.A.T.; CHAVES, V.C.; REGINATTO, F.H.; LISBOA, M.T.; RIBEIRO, A.S.; LENCINA, C.L.; STEFANELLO, F.M.; SPANEVELLO, R.M. Combined actions of blueberry extract and lithium on neurochemical changes observed in an experimental model of mania: exploiting possible synergistic effects. **Metabolic Brain Disease**. v.34, p.605–619, 2018.

STEEN, E.; TERRY, B.M.; RIVERA, E.J.; CANNON, J.L.; NEELY, T.R.; TAVARES, R.; XU, X.J.; WANDS, J.R.; DE LA MONTE, S.M. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? **Journal Alzheimers Disease**. v.7, p.63-80, 2005.

SUBASH, S.; ESSA, M.M.; AL-ADAWI, S.; MEMON, M.A.; MANVASAGAM, T.; AKBAR, M. Neuroprotective effects of berry fruits on neurodegenerative diseases. **Neural Regeneration Research**. v.9, p.1557– 1566, 2014.

TAIPA, R.; DAS NEVES, S.P.; SOUSA, A.L.; FERNANDES, J.; PINTO, C.; CORREIA, A.P.; SANTOS, E.; PINTO, P.S.; CARNEIRO, P.; COSTA, P.; SANTOS, D.; ALONSO, I.; PALHA, J.; FERNANDA, M.; CAVACO, S.; SOUSA, N. Pro and anti-inflammatory cytokines in the CSF of Alzheimer's disease patients and their correlation with cognitive decline. **Neurobiology of Aging**. v.76, p.125-132, 2019.

TALAAT, R.M.; MOHAMED, Y.A.; MOHAMAD, E.H.; ELSHARKAWY, M.; GUIRGIS, A.A. Interleukin 10 (– 1082 G/A) and (– 819 C/T) gene polymorphisms in Egyptian women with polycystic ovary syndrome (PCOS). **Meta Gene**. v.9, p.254–258, 2016.

TANG, K.S. The cellular and molecular process associated with scopolamine-induced memory déficit: A model of Alzheimer's biomarkers. **Life Sciences**. v.233, p.1-6, 2019.

TEIXEIRA, F.C.; GUTIERRES, J.M.; SOARES, M.S.P.; MATTOS, B.S.; SPOHR, L.; COUTO, C.A.T.; BONA, N.P.; ASSMANN, C.E.; MORSCH, V.M.; CRUZ, I.B.M.; STEFANELLO, F.M.; SPANEVELLO, R.M. Inosine protects against impairment of memory induced by experimental model of Alzheimer disease: a nucleoside with multitarget brain actions. **Psychopharmacology**. v.273, p.811-823, 2020.

WANG, D.S.; JONKER, J.W.; KATO, Y.; KUSUHARA, H.; SCHINKEL, A.H.; SUGIYAMA, Y.; Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.302, p.510-515, 2002.

WINIARSKA-MIECZAN, A. Protective effect of tea against lead and cadmium-induced oxidative stress—a review. **Biometals**. v.31, p.909–26, 2018.

YUAN, T.F.; GU, S.; SHAN, C.; MARCHADO, S.; ARIAS-CARRIÓN, O. Oxidative Stress and Adult Neurogenesis. **Stem Cell Reviews and Reports**. v.11, p.706–709, 2015.

ZHAO, W.Q.; ALKON, D.L. Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v.177, p.125-134, 2001.

ZHOU, Z.; Peng, X.; Insolera, R.; Fink, D.J.; Mata, M. IL-10 promotes neuronal survival following spinal cord injury. **Experimental Neurology**. v.220, p.183-190, 2009.

ANEXOS

I. Carta de Aceite do CEUA do protocolo de SCO

08/10/2021 14:43

SEI/UFPEL - 1456787 - Parecer



PARECER Nº
PROCESSO Nº

117/2021/CEUA/REITORIA
23110.027350/2021-12

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **“Efeito neuroprotetor do extrato de amora preta (*Rubus sp.*) em um modelo de amnésia induzido por escopolamina em ratos”**, registrada com o nº **23110.027350/2021-12**, sob a responsabilidade de **Roselia Maria Spanevello** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais, em reunião de oito de outubro de 2021.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	Início = 15/10/2021 Término = 15/10/2023
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Nº de animais	84
Idade	60 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central - UFPel

Código para cadastro nº CEUA **027350/2021-12**

Priscila Marques Moura de Leon

Coordenadora da CEUA

https://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=1648503&infra_sist... 1/2

II. Carta de Aceite do CEUA do protocolo de STZ

01/02/23, 23:45

SEI/UFPeI - 0736559 - Parecer



PARECER Nº
PROCESSO Nº

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
135/2019/CEEA/REITORIA
23110.042067/2019-98

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Relação entre diabetes e Alzheimer: investigação de mecanismos neuroquímicos e o papel protetor da amora preta (*Rubus spp*)**”, registrada com o nº 23110.042067/2019-98, sob a responsabilidade de **Rosélia Maria Spanevello** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de **07 de outubro de 2019**.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	01/12/2019 a 01/12/2022
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar
Nº de animais	154
Idade	130 com 60 dias e 24 RN
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central - UFPeI

Código para cadastro nº CEEA **42067-2019**

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA