



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

JULIETE TAVARES

**EFEITO NEUROPROTETOR DA *SPIRULINA PLATENSIS* EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS AO MODELO DE DOENÇA DE ALZHEIMER ESPORÁDICA
INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA**

FORTALEZA
2023

JULIETE TAVARES

EFEITO NEUROPROTETOR DA *SPIRULINA PLATENSIS* EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS AO MODELO DE DOENÇA DE ALZHEIMER ESPORÁDICA
INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências Médicas. Área de concentração: doenças crônicas degenerativas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Geanne Matos de Andrade.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos
pelo(a) autor(a)

T23e Tavares, Juliete.

Efeito neuroprotetor da *Spirulina platensis* em camundongos submetidos ao modelo de Doença de Alzheimer esporádica induzida por estreptozotocina / Juliete Tavares. – 2023.

151 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2023. Orientação: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade.

1. Doença de Alzheimer. 2. *Spirulina platensis*. 3. Estreptozotocina. 4. Memória. 5. Neuroproteção. I. Título.

CDD 610

JULIETE TAVARES

EFEITO NEUROPROTETOR DA *SPIRULINA PLATENSIS* EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS AO MODELO DE DOENÇA DE ALZHEIMER ESPORÁDICA
INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências Médicas. Área de concentração: Doenças crônico-degenerativas.

Aprovada em 28/02/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Geanne Matos de Andrade (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^ª. Dr^ª. Glauce Socorro de Barros Viana
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^ª. Dr. Pedro Filho Noronha de Souza
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Fernando Carlos Borja dos Santos
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG

Prof^ª. Dr^ª. Mariana Ferreira Pereira de Araújo
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

À Deus e Maria santíssima,

hoje e sempre.

AGRADECIMENTOS

A Deus e Maria santíssima, fonte da vida, inspiração maior.

A toda a minha família, que hoje, comemora mais esta vitória, pelo amor incondicional e por me fazer superar vários momentos de dificuldades, pela confiança depositada em mim.

Ao meu noivo, hoje marido, Daniel, que sempre esteve ao meu lado. Obrigada meu amor por todo cuidado e apoio.

A minha orientadora professora Dra. Geanne Matos de Andrade por ter me aceitado em seu laboratório e por ter acreditado em mim. Obrigada pela oportunidade de trabalhar ao seu lado.

A todo o laboratório de Neurociências e Comportamento, em especial aos meus amigos Tyciane e Alfaete, que estiveram ao meu lado em todo o trajeto.

Ao professor Tiago Sampaio e ao Helyson Lucas por ter contribuído com o desenvolvimento desse trabalho.

Aos membros da minha banca.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Médicas por mais uma vez ter me ajudado, em especial a Ivone.

A FUNCAP pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos que me ajudaram nessa jornada.

“Sempre ocorre aprendizagem, no entanto ela só “cria raízes” quando se transforma numa memória.”

Ana Lúcia Hennemann

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva, que causa perda gradual de memória e comprometimento cognitivo. Injeções intracerebroventriculares de estreptozotocina (ICV-STZ) têm sido utilizadas como um modelo experimental de Doença de Alzheimer esporádica (DAE) porque produzem déficits na sinalização cerebral de insulina, estresse oxidativo, neuroinflamação e neurodegeneração, resultando em declínio cognitivo e comprometimento da memória. A *Spirulina platensis* (SPI) é um nutracêutico com propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e neuroprotetoras. O objetivo do trabalho foi estudar os efeitos da SPI sobre os déficits cognitivos e dano neuronal em camundongos submetidos ao modelo experimental da DAE induzida por ICV-STZ. Camundongos Swiss machos (25-35 g) receberam ICV-STZ (3 mg/Kg) bilateralmente, no dia 1 e 3 do experimento. A SPI (50 e 100 mg/Kg, v. o.) ou veículo (salina), foi administrada 2h após a segunda cirurgia, 1 vez ao dia durante 16 dias. Os resultados mostraram que não houve alteração na glicemia. O tratamento com SPI preveniu contra os déficits de memória de trabalho, episódica, espacial e aversiva. A atividade locomotora e os parâmetros relacionados a ansiedade no LCE, não foram alterados. As ICV-STZ causaram aumento de MDA, Nitrito e ânion superóxido, enquanto diminuíram GSH. O tratamento com SPI protegeu contra esse aumento, e aumentou GSH no córtex pré-frontal e hipocampo e inibiu a atividade da AChE, no córtex pré-frontal. As ICV-STZ causaram astrogliose e microgliose, diminuíram o número de neurônios imunorreativos para BDNF e causaram morte neuronal no córtex pré-frontal e hipocampo. O tratamento com SPI, preveniu a astrogliose, microgliose e morte neuronal, porém não foi eficaz na prevenção da depleção de BDNF. As análises de *docking molecular* mostraram que a ficocianobilina se ligou aos alvos AChE e IRS-1. Esses achados destacam o potencial terapêutico da SPI para o tratamento da DAE, indicando que sua ação neuroprotetora está ligada às atividades antioxidante, anti-inflamatória e inibidora da AChE.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer. *Spirulina platensis*. Estreptozotocina. Memória. Neuroproteção.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease that causes gradual memory loss and cognitive impairment. Intracerebroventricular injections of streptozotocin (ICV-STZ) have been used as an experimental model of sporadic Alzheimer's disease (SAD) because they produce deficits in brain insulin signaling, oxidative stress, neuroinflammation, and neurodegeneration, resulting in cognitive decline and memory impairment. *Spirulina platensis* (SPI) is a nutraceutical with anti-inflammatory, antioxidant, and neuroprotective properties. The objective of this work was to study the effects of SPI on cognitive deficits and neuronal damage in mice submitted to the experimental model of SAD induced by ICV-STZ. Male Swiss mice (weighing 25–35 g) received ICV-STZ (3 mg/kg) bilaterally on days 1 and 3 of the experiment. SPI (50 and 100 mg/Kg, p.o.) or vehicle (saline) was administered 2 hours after the second surgery, once a day for 16 days. The results showed that there was no change in blood glucose. SPI treatment prevented working, episodic, spatial, and aversive memory deficits. Locomotor activity and parameters related to anxiety in the EPM were not altered. ICV-STZ caused an increase in MDA, nitrite, and superoxide anion, while decreasing GSH. SPI treatment protected against this increase and increased GSH in the prefrontal cortex and hippocampus. It inhibited AChE activity in the prefrontal cortex. ICV-STZ caused astrogliosis and microgliosis, decreased the number of BDNF-immunoreactive neurons, and caused neuronal death in the prefrontal cortex and hippocampus. Treatment with SPI prevented astrogliosis, microgliosis, and neuronal death, but it was not effective in preventing BDNF depletion. Molecular docking analyses showed that phycocyanobilin was tightly bound to AChE and IRS-1 targets. These findings highlight the therapeutic potential of SPI for the treatment of SAD, indicating that its neuroprotective action is linked to antioxidant, anti-inflammatory, and AChE inhibitory activities.

Key-word: Alzheimer's disease. *Spirulina platensis*. Streptozotocin. Memory. Neuroprotection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Doença de Alzheimer, patogênese e estágios.....	22
Figura 2	Processamento da Proteína Percursora Amiloide (APP).....	31
Figura 3	Visão geral do sistema de sinalização de insulina.....	35
Figura 4	Molécula de Estreptozotocina.....	43
Figura 5	Visão geral do sistema de sinalização de insulina.....	44
Figura 6	Imagens microscópicas capturadas da <i>Spirulina platensis</i>	47
Figura 7	Protocolo experimental.....	56
Figura 8	Procedimento de cirurgia estereotáxica.....	58
Figura 9	Campo Aberto.....	59
Figura 10	Labirinto em Y.....	60
Figura 11	Teste de reconhecimento de objetos.....	61
Figura 12	Esquiva Passiva.....	62
Figura 13	Labirinto Aquático de Morris.....	63
Figura 14	Labirinto em Cruz Elevado.....	64
Figura 15	Níveis de glicose no sangue periférico de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.....	72
Figura 16	Efeito da SPI (50 e 100 mg/Kg, v.o.) sobre a atividade locomotora (campo aberto).....	73
Figura 17	Efeito da SPI (50 e 100 mg/Kg) sobre a memória de trabalho (Y-maze).....	74
Figura 18	Efeito da SPI (50 e 100 mg/Kg) sobre a memória episódica (teste de reconhecimento de objetos).....	75
Figura 19	Efeito da SPI (50 e 100 mg/Kg) sobre a memória aversiva (teste da esquiva passiva).....	76
Figura 20	Efeito da SPI (50 e 100 mg/Kg) sobre a memória espacial (Teste do Labirinto Aquático).....	77
Figura 21	Efeito da SPI (100 mg/Kg) sobre a peroxidação lipídica no córtex pré-frontal e no hipocampo.....	80
Figura 22	Efeito da SPI (100 mg/Kg) sobre a dosagem de nitrito/nitrato (NO ₂ /NO ₃) no córtex pré-frontal e no hipocampo.....	81
Figura 23	Efeito da SPI (100 mg/Kg) sobre a acumulação de superóxido no córtex pré-frontal e no hipocampo.....	82

Figura 24	Efeito da SPI (100 mg/Kg) sobre a glutatona reduzida (GSH) no córtex pré-frontal e no hipocampo.....	83
Figura 25	Efeito da SPI (100 mg/Kg, v.o.) sobre a atividade da AChE no córtex pré-frontal e no hipocampo.....	84
Figura 26	Fotomicrografias representativas da imunorreatividade para GFAP no córtex pré-frontal.....	85
Figura 27	Efeito da SPI (100 mg/kg, v.o.) sobre a imunorreatividade para GFAP (astrócitos) no córtex pré-frontal.....	85
Figura 28	Fotomicrografias representativas da imunorreatividade para GFAP no hipocampo.....	86
Figura 29	Efeito da SPI (100 mg/Kg, v.o.) sobre a imunorreatividade para GFAP (astrócitos) no hipocampo.....	87
Figura 30	Fotomicrografias representativas da imunorreatividade para IBA-1 (micróglia) no córtex pré-frontal.....	88
Figura 31	Efeito da SPI (100 mg/Kg, v.o.) sobre a imunorreatividade para IBA-1 (micróglia) no córtex pré-frontal.....	88
Figura 32	Fotomicrografias representativas da imunorreatividade para IBA-1 (micróglia) no hipocampo.....	89
Figura 33	Efeito da SPI (100 mg/Kg, v.o.) sobre a imunorreatividade para IBA-1 (micróglia) no hipocampo.....	89
Figura 34	Fotomicrografias representativas da imunorreatividade para BDNF no córtex pré-frontal.....	91
Figura 35	Efeito da SPI (100 mg/Kg, v.o.) sobre a imunorreatividade para BDNF no córtex pré-frontal.....	91
Figura 36	Fotomicrografias representativas da imunorreatividade para BDNF no hipocampo.....	92
Figura 37	Efeito da SPI (100 mg/Kg, v.o.) sobre a imunorreatividade para BDNF no hipocampo.....	93
Figura 38	Fotomicrografias representativas da coloração de Cresil Violeta no córtex pré-frontal.....	94
Figura 39	Efeito da SPI (100 mg/kg, v.o.) sobre a viabilidade celular avaliada pela coloração para Cresil violeta no córtex pré-frontal.....	94
Figura 40	Fotomicrografias representativas da coloração de Cresil Violeta no hipocampo.....	95

Figura 41	Efeito da SPI (100 mg/kg, v.o.) sobre a viabilidade celular avaliada pela coloração para Cresil violeta no hipocampo.....	96
Figura 42	Ilustração da interação 2D e 3D entre ficocianobilina AChE e IRS1..	97
Figura 43	Visão geral dos mecanismos de ação da SPI.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Constituintes bioativos da SPI.....	48
Tabela 2	Grupos de experimentais.....	55
Tabela 3	Efeito da SPI (50 e 100 mg) sobre os parâmetros comportamentais relacionado a ansiedade (Labirinto em Cruz Elevado - LCE)	79
Tabela 4	Representação das energias de ligação (em kcal/mol) entre ficocianobilina e AChE e IRS-1.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ACTI	Acetiltiocolina
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
Akt	Proteína quinase B
APOE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora amiloide
A β	Peptídeo β -amiloide
BACE1	Enzima β -secretase 1
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE	Barreira hematoencefálica
CA	Campo Aberto
CA1	Corno de Amon 1
CA3	CA3 Corno de Amon 3
GD	Giro Denteado
CAT	Catalase
DA	Doença de Alzheimer
DAE	Doença de Alzheimer Esporádica
DAF	Doença de Alzheimer Familiar
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DP	Doença de Parkinson
ENFs	Emaranhados neurofibrilares
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GLUT 2	Transportador de glicose 2
GPX	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSK3	Glicogênio sintase quinase-3
ICV-STZ	Injeções intracerebroventricular de STZ

IDE	Enzima de degradação da insulina
IGF-1 e 2	Fator de crescimento semelhantes à insulina 1 e 2
IL	Interleucinas
IFN- γ	Interferon-gama
IR	Receptor de insulina
IRS 1 e 2	Substrato do Receptor de Insulina 1 e 2
LCE	Labirinto em cruz elevado
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
NEP	neprilisina
<i>NF-κB</i>	fator de transcrição como e fator nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Óxido nítrico
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PSEN1 e 2	presenilina 1 e 2
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso periférico
SOD	Superóxido dismutases,
SPI	<i>Spirulina platensis</i>
STZ	Estreptozotocina
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF α	Fatores de Necrose Tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
1.1	A Doença de Alzheimer	19
1.2	Epidemiologia	20
1.3	Sintomas da DA	21
1.4	Etiologia e fatores de risco	22
1.5	Neuropatologia.....	24
1.6	Memória	25
1.7	Fisiopatologia.....	27
1.7.1	Hipótese colinérgica.....	27
1.7.2	Hipótese glutamatérgica	28
1.7.3	Hipótese da Cascata Amiloide	29
1.8	DA e resistência à insulina no SNC	33
1.9	Tratamento farmacológico da DA	36
1.10	Neuroinflamação	37
1.11	Estresse Oxidativo	39
1.12	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e DA	42
1.13	Modelo experimental de DAE por injeção intracerebroventricular de estreptozotocina (STZ).....	43
1.14	Neuroproteção e compostos naturais	45
1.15	<i>Spirulina platensis</i> (SPI).....	46
1.16	Constituintes bioativos da <i>Spirulina</i>	50
1.16.1	Ficobiliproteínas.....	50
2.	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	52
3.	OBJETIVOS	53
3.1	Objetivo Geral	53
3.2	Objetivos Específicos.....	53
4.	METODOLOGIA.....	54
4.1	Animais	54
4.2	Drogas	54
4.3	Cultivo de SPI	54
4.4	Protocolo Experimental.....	55
4.5	Dosagem da glicemia.....	57

4.6	Cirurgia Estereotáxica: Modelo de Doença de Alzheimer Esporádica (DAE) induzido por Estreptozotocina (STZ).....	57
4.7	Testes comportamentais.....	58
4.7.1	Avaliação da atividade locomotora - Teste do Campo Aberto (CA)	58
4.7.2	Avaliação da memória de trabalho - Teste do labirinto em Y	59
4.7.3	Avaliação da memória de reconhecimento – Teste do Reconhecimento de Objetos.....	60
4.7.4	Avaliação da memória aversiva – Teste da Esquiva Passiva	61
4.7.5	Avaliação da memória espacial - Teste do Labirinto Aquático	62
4.7.6	Avaliação da ansiedade – teste do Labirinto em cruz elevado (LCE)	63
4.8	Avaliações bioquímicas.....	64
4.8.1	Determinação da peroxidação lipídica	64
4.8.2	Determinação da concentração de nitrito/nitrato.....	65
4.8.3	Acúmulo de superóxido.....	65
4.8.4	Determinação dos níveis de Glutathione reduzida (GSH).....	66
4.8.5	Avaliação da atividade AChE <i>in vivo</i>	66
4.9	Análises histopatológicas.....	67
4.9.1	Perfusão Transcardíaca.....	67
4.9.2	Microtomia	68
4.9.3	Avaliação da astrogliose e microgliose através da imunomarcacão para GFAP e IBA-1 e avaliação da plasticidade sináptica através da imunomarcacão para BDNF.....	68
4.9.4	Avaliação de morte celular através da coloração de Cresil Violeta.....	69
4.10	Estudo de modelagem molecular.....	70
4.10.1	<i>Docking molecular</i>	70
5.	RESULTADOS	72
5.1	Avaliação da glicemia	72
5.1.1	Níveis de glicose no sangue periférico em camundongos submetidos ao modelo de DAE por administração ICV-STZ.....	72
5.2	Avaliação comportamental.....	72
5.2.1	Efeito do extrato aquoso de SPI (50 e 100 mg/Kg) sobre a atividade locomotora (teste do campo aberto)	72
5.2.2	Efeito do extrato aquoso de SPI (50 e 100 mg/Kg) sobre a memória de trabalho (Y-maze).	73

5.2.3	Efeito do extrato aquoso de SPI (50 e 100 mg/Kg) sobre a memória episódica (teste de reconhecimento de objetos).....	74
5.2.4	Efeito do extrato aquoso de SPI (50 e 100 mg/Kg) sobre a memória aversiva recente e tardia (teste da esQUIVA passiva)	75
5.2.5	Efeito do extrato aquoso de SPI (50 e 100 mg/Kg) sobre a memória espacial (Teste do Labirinto Aquático).	76
5.2.6	Efeito do extrato aquoso de SPI (50 e 100 mg/Kg) sobre a ansiedade (Labirinto em cruz elevado).....	79
5.3	Avaliação bioquímica	80
5.3.1	Efeito do extrato aquoso de SPI (100 mg/Kg) sobre a peroxidação lipídica avaliado através da dosagem de (MDA) no córtex pré-frontal e hipocampo.....	80
5.3.2	Efeito do extrato aquoso de SPI (100 mg/Kg) sobre a dosagem de nitrito/nitrato (NO ₂ /NO ₃) no córtex pré-frontal e hipocampo	80
5.3.3	Efeito do extrato aquoso de SPI (100 mg/Kg) sobre a acumulação de superóxido no córtex pré-frontal e hipocampo	81
5.3.4	Efeito do extrato aquoso de SPI (100 mg/Kg) sobre a concentração de glutatona reduzida (GSH) no córtex pré-frontal e hipocampo	82
5.3.5	Efeito do extrato aquoso de SPI (100 mg/Kg) sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no córtex pré-frontal e hipocampo.....	83
5.4	Análises histopatológicas.....	84
5.4.1	Efeito do extrato aquoso de SPI (100 mg/Kg) sobre a ativação de astrócitos evidenciada através da imunomarcacão para GFAP no córtex pré-frontal e hipocampo.....	84
5.4.2	Efeito do extrato aquoso de SPI (100 mg/Kg) sobre a ativação microglial evidenciada através da imunomarcacão para IBA-1 no córtex pré-frontal e hipocampo.....	87
5.4.3	Efeito do extrato aquoso de SPI (100 mg/Kg) sobre a plasticidade sináptica evidenciada através da imunomarcacão para BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo.....	90
5.4.4	Efeito do extrato aquoso de SPI (100 mg/Kg) sobre a integridade neuronal evidenciada através da coloracão com o Cresil violeta no córtex pré-frontal.....	93
5.5	Experimentos <i>In sílico</i>	96
5.5.1	<i>Docking molecular</i>	96
6.	DISCUSSÃO	98

7. CONCLUSÕES	111
REFERÊNCIAS	112
ANEXO A – CERTIFICADO CEUA UFC.....	151

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Doença de Alzheimer

Em 1907, o neuropatologista alemão Alois Alzheimer descreveu, pela primeira vez, uma forma de demência que posteriormente ficou conhecida como Doença de Alzheimer (DA) (MAURER; VOLK; GERBALDO, 1997). Ele relatou e descreveu o caso de uma paciente chamada Auguste D, uma mulher de 51 anos que tinha mostrado comprometimento cognitivo progressivo, sintomas focais, alucinações, delírios, mudanças comportamentais em sua personalidade, com relatos de problemas na memória, além de dificuldades na fala e prejuízo na compreensão. Com a morte de Auguste D em 1906, Alois Alzheimer passou a estudar as características neuropatológicas da doença, após realização da necropsia, descobriu-se a presença de placas, emaranhados neurofilamentares e alterações arterioscleróticas, majoritariamente, na região do córtex cerebral. Assim, Alois Alzheimer publicou seus achados sob o título “Uma doença grave característica do córtex cerebral”. Atualmente, esses achados histopatológicos são os indicativos mais marcantes da DA (GONZÁLEZ; LÉGER, 2019; JELLINGER, 2006; MAURER; VOLK; GERBALDO, 1997).

Além das extraordinárias publicações de Alois Alzheimer em 1907, outros pesquisadores descreveram as mesmas características comportamentais e histopatológicas observadas e relatadas por ele, em outros pacientes. Por exemplo, Fischer (1907) publicou uma descrição detalhada dessas alterações histopatológicas. Bonfiglio (1908) relatou que um paciente de 60 anos, apresentava sintomas e achados histopatológicos semelhantes ao caso de Auguste D. Perusini (1909) republicou o caso Auguste D, confirmando as observações de Alois Alzheimer. Entretanto, somente na 8ª edição o *Handbook of Psychiatry* (1910), Kraepelin mencionou, pela primeira vez, o termo “Doença de Alzheimer” em referência, as descobertas do seu amigo, Alois Alzheimer. Dessa forma, Kraepelin introduziu o epônimo Alzheimer, que foi baseado no relatório de Alois Alzheimer de 1907 sobre o caso de Auguste D, ficando conhecida como DA (MAURER; VOLK; GERBALDO, 1997; HIPPIUS; NEUNDÖRFER, 2003; JELLINGER, 2006).

1.2 Epidemiologia

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva crônica relacionada a idade, sendo a forma mais comum de demência, compreendendo de 60 a 70% de todos os casos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2021). De acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS, 2021), atualmente, cerca de 55 milhões de pessoas vivem com demência em todo o mundo. Com o aumento da população idosa, em quase todos os países, estima-se que esse número aumente para 78 milhões em 2030 e 139 milhões em 2050 (NICHOLS et al., 2022; MAYEUX; STERN, 2022; OMS, 2021).

O fator de risco mais associado ao desenvolvimento de demência, do tipo Alzheimer, é o envelhecimento. Por exemplo, em países desenvolvidos, a prevalência de DA em indivíduos com idade de 65 anos é de 1,5%, aumentando para 30% em indivíduos com idade superior a 80 anos (APRAHAMIAN et al., 2009). A taxa de incidência para o grupo de 60 a 64 anos é de 3,4/1.000 pessoas e alcança 99,4/1.000 pessoas em indivíduos acima de 95 anos. Ademais, afeta desproporcionalmente as mulheres, tornando-as mais propensas do que os homens a desenvolver DA após os 80 anos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2021; SCHELTENS et al., 2021).

Segundo a Associação Brasileira de Alzheimer (2020), no Brasil estima-se uma prevalência de 1,5 milhão de pessoas com diagnóstico de demência. César-Freitas *et al.* (2021) realizaram um estudo populacional no município de Tremembé, em São Paulo, ao analisar 20% da população com mais de 60 anos e foi observado que a taxa de incidência de demência foi de 26,1 por 1.000 pessoas. Em análise mais detalhada, realizada dentro de grupos etários separados demonstraram que esse risco aumentou exponencialmente, sendo de 8,3/1.000 pessoas, em indivíduos de 60 a 64 anos, chegando a 110,2/1.000 pessoas na faixa etária dos 80 anos.

Essas evidências epidemiológicas sugerem que a prevalência da DA está diretamente relacionada ao envelhecimento da população, e que seu crescimento ocorre exponencialmente com o aumento da idade. Conforme dados do Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA) nos cenários IBGE/IPEA (2018), os mais jovens representarão, em 2100, aproximadamente 9% da população, enquanto os idosos, cerca de 40%. Como resultado, provavelmente haverá mais pessoas vivendo com demência no futuro, e as políticas de saúde pública precisarão ser fortalecidas para atender às necessidades desse grupo (NICHOLS et al., 2022).

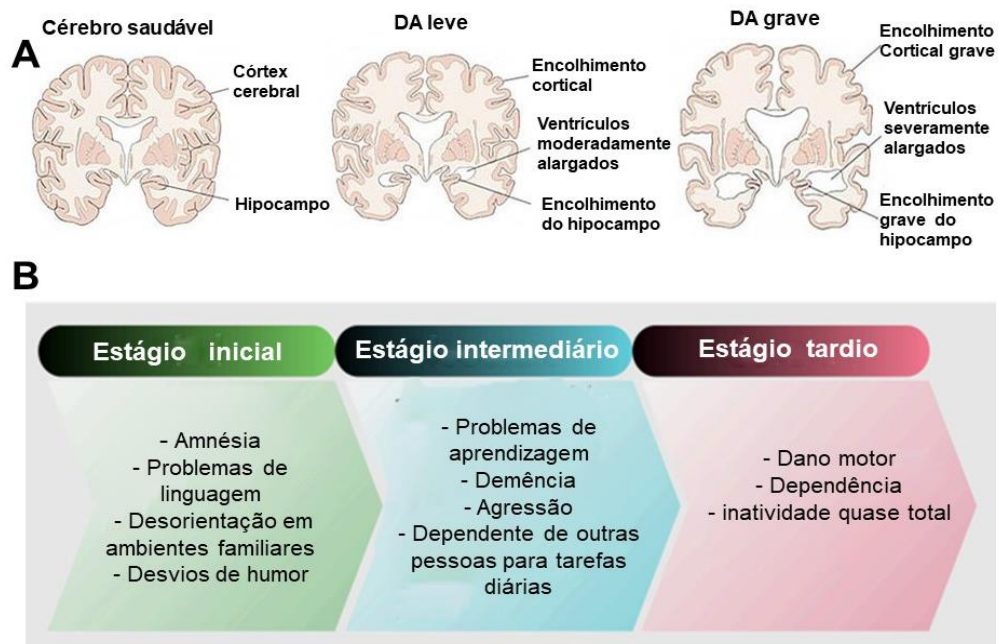
Além disso, a OMS (2021) estima que o custo social da demência no mundo em 2019 foi de cerca de US\$ 1,3 trilhão, e espera-se que continue crescendo em conjunto com o número de indivíduos que vivem com demência. Prevê-se que até o final do ano de 2030, os custos serão superiores a US\$ 2,8 trilhões.

1.3 Sintomas da DA

A demência é caracterizada pelo declínio das funções cognitivas, que excede o que se pode esperar das consequências normais do envelhecimento biológico. Memória, raciocínio, orientação, compreensão, capacidade de aprendizagem, linguagem e julgamento são todos afetados, que resultam da alteração de múltiplos fatores etiológicos, incluindo fatores ambientais, genéticos e metabólicos, e dentre esses, a redução do metabolismo de glicose e utilização de energia que são observados nos estágios iniciais da doença. Mudanças no humor, controle emocional, comportamento ou motivação são frequentemente associadas e ocasionalmente precedem o comprometimento cognitivo (WHO, 2021; CHEN et al., 2013).

A DA é o tipo mais comum de demência, e os sinais e sintomas dessa doença podem ser divididos em três estágios (Figura 1), a fase inicial é frequentemente negligenciada devido ao seu início lento, podendo incluir amnésia, problemas de linguagem, perda da noção do tempo e desorientação em ambientes familiares. À medida que a demência avança para o estágio intermediário, os sintomas se tornam mais aparentes e podem incluir o esquecimento de eventos recentes e nomes de pessoas, mudanças de comportamento, como perambulação e questionamentos constantes, e necessidade de assistência com cuidados pessoais devido à crescente confusão em casa e dificuldade de comunicação. A fase tardia é caracterizada por dependência e inatividade quase total (VILLEMAGNE et al., 2017; LYU et al., 2018; Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - DSM-V).

Figura 1. Sinais e sintomas da DA com estágios característicos da doença



Fonte: Adaptado de Faiyaz et al. (2021). "The Progression of Alzheimer's Disease | BrightFocus Foundation" (2015). Na DA leve podemos observar atrofia moderada dos lobos temporal, frontal e hipocampal, bem como aumento dos ventrículos laterais, quando comparados a um cérebro saudável. Durante a DA grave há atrofia cortical e hipocampal significativa, juntamente com aumento drástico dos ventrículos laterais (A). Na imagem (B) sintomas típicos associados aos estágios da doença (inicial, intermediário e tardio).

1.4 Etiologia e fatores de risco

A DA é uma doença neurodegenerativa que se caracteriza por uma etiologia complexa e multifatorial que ainda não foi completamente elucidada. A DA pode desenvolver-se de forma familiar ou esporádica. A forma de Doença de Alzheimer Esporádica (DAE) ou de Início Tardio é responsável por mais de 95% dos casos (MISHRA et al., 2018; SHEPPARD; COLEMAN, 2020) e apesar da grande maioria ser de origem esporádica, mutações autossômicas dominante nos genes da proteína precursora amiloide (APP), presenilina 1 (PSEN1), presenilina 2 (PSEN2) (SUH; CHECLER, 2002; LANE; HARDY; SCHOTT, 2018; BATEMAN et al., 2011; OJOPI et al., 2004; CHOURAKI; SESHADRI, 2014) causam a forma de Doença de Alzheimer Familiar/Forma Rara ou de Início Precoce (DAF), responsável por 5% dos casos (FRIDMAN et al., 2004; JELLINGER, 2006). Os sintomas da DAF se

desenvolvem de maneira mais precoce do que na DAE, geralmente entre 30 e 50 anos de idade (BATEMAN et al., 2011).

A principal causa para DAE é o envelhecimento, nesse caso os sintomas aparecem a partir dos 65 anos (SHEPPARD; COLEMAN, 2020). Além do envelhecimento, cerca de 60% do risco de desenvolver DAE é atribuível a fatores genéticos, por exemplo o gene da apolipoproteína E (APOE), apresenta três variantes conhecidas: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$, e a presença da variante $\epsilon 4$ eleva drasticamente o risco de desenvolver DAE, comparado aos portadores não- $\epsilon 4$ (LANE; HARDY; SCHOTT, 2018; CHOURAKI; SESHADRI, 2014)

A DAE não é considerada uma doença genética, porque nenhum gene determina se o indivíduo vai desenvolver a doença. Entretanto, a presença de algumas variantes genéticas elava o risco de desenvolvê-la. Estudos recentes de associação genômica ampla (GWAS) indicaram as variações genéticas comuns em vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) como fatores de risco que contribuem para casos de DAE, localizados em mais de 30 loci, fora do locus APOE (KARCH; GOATE, 2014; CHOURAKI; SESHADRI, 2014; SHEPPARD; COLEMAN, 2020; CHAPUIS et al., 2013; GAO et al., 2021).

Entres os principais genes candidatos como fatores de risco estão, o Receptor relacionado à sortilina 1 (SORL1), Integrador de ponte 1 (BIN1); Clusterina (CLU); Receptor do complemento 1 (CR1); Proteína de montagem de clatrina de ligação a fosfatidilinositol (PICALM); Proteína transmembrana (CD33); Receptor de efrina tipo A 1 (EPHA1); Subfamília de 4 domínios que atravessa a membrana (MS4A4/MS4A6); Transportador de cassete de ligação de ATP A7 (ABCA7); Proteína associada a CD2 (CD2AP); Inositol polifosfato-5-fosfatase (INPP5D); fator potenciador 2C (MEF2C) e mais recentemente o Receptor de ativação de proteína expresso em células mieloides 2 (TREM2) e Fosfolipase D3 (PLD3) (CHOURAKI; SESHADRI, 2014; KARCH; GOATE, 2015; KIM, 2018). Os genes aqui listados denotam e reforçam que vias inflamatórias, processamento da β -amiloide, tráfego celular de proteínas e processos de endocitose estão cada vez mais implicados na progressão da DA.

De acordo com esta teoria, a DAE pode ser causada por uma interação complexa entre fatores genéticos não modificáveis e fatores ambientais modificáveis que estão, fortemente, associados ao desenvolvimento da doença, tais como: diabetes mellitus tipo 2, hiperlipidemia, inflamação, doenças cerebrais, doenças cardiovasculares, síndrome de Down, estilo de vida, estresse, dieta pouco saudável,

falta de exercício físico, álcool, exposição a toxinas ambientais, acidente vascular cerebral, traumatismo cranioencefálico lesões e ainda o uso de tabaco (SHEPPARD; COLEMAN, 2020; LANE; HARDY; SCHOTT, 2018; JOHN; REDDY, 2021; KARCH; GOATE, 2014).

1.5 Neuropatologia

As características neuropatológicas fundamentais da DA são a formação de agregados insolúveis, formando acumulações extracelulares chamadas placas senis e filamentos intracelulares compostos de proteína tau associada aos microtúbulos gerando emaranhados neurofibrilares (ENFs) (SHEPPARD; COLEMAN, 2020). As placas e os emaranhados tendem a se espalhar por todo o córtex cerebral. A velocidade de progressão da doença varia muito, pois essa progressão depende, em parte, da idade da pessoa quando a doença foi diagnosticada e se a pessoa possui outros problemas de saúde (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2022). O acúmulo anormal das placas senis e dos ENFs levam a perda das conexões entre os neurônios e morte celular, acompanhada de atrofia cerebral e diminuição de massa cerebral.

Estudos evidenciaram que outras alterações celulares estão envolvidas com o processo neuropatológico da doença, incluindo disfunção mitocondrial, alterações em mecanismo de autofagia (HAN et al., 2020; REDDY; BEAL, 2008; REDDY et al., 2018; REDDY et al., 2012), aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN); neuroinflamação; excitotoxicidade glutamatérgica; diminuição nos níveis de acetilcolina (ACh); desequilíbrio neuroquímico e resistência cerebral à insulina (JOHN; REDDY, 2021; MCDONALD et al., 2009; SKAPER et al., 2017; SHENG; SABATINI; SUDHOF, 2012; PAASILA et al., 2022; FINSEN et al., 2022; SHEPPARD; COLEMAN, 2020; JOHN; REDDY, 2021; WATSON; CRAFT, 2003; KELLAR; CRAFT, 2020).

Outros estudos apontam que neuropatologia da DA pode iniciada pela morte de células piramidais da região do CA1, no hipocampo, e nas regiões entorrinais espalhando-se pelos córtices fronto-temporais, áreas do cérebro que são essenciais para codificação, consolidação, armazenamento de memória e aprendizado, além de afetar outros domínios cognitivos: como linguagem, julgamento, comportamento, personalidade e orientação espacial em estágios mais avançado da doença, a morte

de células atinge o corpo estriado, tálamo e áreas subcorticais (DUARA et al., 2008; BRAAK; BRAAK, 1991; SELKOE, 2002; ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2022; LAZAROV; HOLLANDS, 2016).

Dessa forma, tanto a memória explícita quanto a implícita são afetadas na DA, indivíduos com demência têm dificuldade de pensar, de armazenar e recuperar novas memórias; descrever conceitos abstratos e deterioração da função cognitiva (SELKOE, 2002; LAZAROV; HOLLANDS, 2016). Além disso podem desenvolver depressão e ansiedade agravando os déficits cognitivos (MOHAMED NOUR; JIAO; TENG, 2021; MENDEZ, 2021). Com a progressão da doença, ocorre um declínio expressivo das habilidades executivas e demência tornando pacientes com DA incapazes de realizar as atividades cotidianas.

1.6 Memória

O termo "memória" refere-se à capacidade de adquirir, armazenar e referenciar informações obtidas pelas experiências diárias (LENT, 2001), podendo ser dividida em três categorias, de acordo com seus correlatos neuroanatômicos e neurofisiológicos: memória de trabalho, memória de curto prazo e memória de longo prazo (SQUIRE; DEDE, 2015; JAHN, 2013).

A memória operacional ou de trabalho é extremamente breve e efêmera e armazena (segundos ou minutos) conhecimentos relevantes apenas para o pensamento imediato e a resolução de problemas (IZQUIERDO; MEDINA, 1991). As regiões responsáveis pelo processamento cognitivo são o córtex pré-frontal ventrolateral e dorsolateral (MOSCOVITCH, 1992).

A memória de curto prazo, que pode reter informações de alguns minutos a algumas horas, é a base de nossa experiência atual. Essa memória de curto prazo é regulada pelas regiões dos lobos frontal e parietal do cérebro e compreende memórias de eventos em andamento que podem ser consolidadas e/ou convertidas em memória de longo prazo (SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1996; DUDAI, 2004; TAKEHARA-NISHIUCHI, 2021).

A consolidação é o processo pelo qual as memórias de curto prazo são transformadas em memórias de longo prazo, é dependente do hipocampo e das regiões entorrinal, perirrinal e para-hipocampal do córtex temporal medial

(TAKEHARA-NISHIUCHI, 2021; FOTUHI et al., 2020; SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1996). A potenciação de longo prazo (LTP) e a depressão de longo prazo (LTD) são dois sistemas que supostamente explicam esse fenômeno e contribuem no desenvolvimento da memória. De fato, a LTP é bastante evidente e duradoura na região CA1 do hipocampo, e está implicada na maioria dos tipos de formação de memória (IZQUIERDO; MCGAUGH, 2000; TAKEHARA-NISHIUCHI, 2021). Além disso, a consolidação envolve uma variedade de mecanismos, como transcrição gênica ou produção de novas moléculas, que permitem manter e consolidar informações sensíveis e lábeis a perturbações da rede neural (IZQUIERDO; MCGAUGH, 2000).

A memória de longo prazo parece ter armazenamento praticamente ilimitado por um tempo infinito, e pode ser adicionalmente subdividida em memória explícita (declarativa), incluindo dois tipos de memória episódica e semântica (SQUIRE; DEDE, 2015; STRAUSS; SHERMAN; SPREEN, 2006). Dados indicam que a memória semântica é inicialmente reduzida em pacientes com DA, impactando na fluência verbal e na nomeação de pessoas e lugares, e essa perda semântica na DA pode se desenvolver anos antes da doença ser diagnosticada (VERMA; HOWARD, 2012).

A memória não declarativa (implícita) refere-se a muitas formas de memórias que são inacessíveis à mente consciente. Entre elas estão habilidades e hábitos de aprendizado, condicionamento clássico e *priming* ou pré-ativação, que é definido como a capacidade de perceber ou identificar um sinal devido a experiências passadas (SQUIRE; DEDE, 2015). Esses sistemas de memória dependem variadamente do hipocampo e de estruturas relacionadas no giro para-hipocampal, bem como da amígdala, corpo estriado, cerebelo, neocórtex, córtex perirrinal e entorrinal (THOMPSON; KIM, 1996; IZQUIERDO; MCGAUGH, 2000; SQUIRE; DEDE, 2015; OPITZ, 2014).

O neocórtex e o hipocampo são duas áreas cerebrais cruciais na formação da memória (JAHN, 2013; DUDAI; MORRIS, 2013). Embora a neurodegeneração crescente seja uma das principais alterações morfológicas da DA, crescentes evidências sugerem que a disfunção e perda de conexões sinápticas, no neocórtex e hipocampo, pode ser um evento precursor da doença (POOLER; NOBLE; HANGER, 2014; SCHEFF et al., 2007). Déficits na capacidade de criar e reter novas memórias são as manifestações clínicas mais precoces da DA. Além disso, a DA, também é

caracterizada por atrofia neocortical progressiva com perda progressiva de sinapses e neurônios (JAHN, 2013).

Em cérebros de autópsias, placas senis e emaranhados neurofibrilares são alterações neuropatológicas que surgem no córtex entorrinal e formações hipocâmpais e avançam para os córtices de associação temporal, parietal e frontal e são indicadores neuropatológicos do processo de atrofia na DA (BRAAK; BRAAK, 1990; BRAAK; BRAAK, 1991; HYMAN et al., 1984; PANTEL et al., 2004).

1.7 Fisiopatologia

Nas últimas décadas, muitos estudos propuseram diferentes hipóteses sobre as bases moleculares da DA. A teoria mais antiga é representada pela hipótese colinérgica, postulada no início da década de 80, apoiada por estudos farmacológicos, bioquímicos e eletrofisiológicos, os quais sustentam, fortemente, o papel da disfunção colinérgica nos distúrbios de memória relacionados ao envelhecimento (BARTUS et al., 1982; SHERMAN et al., 1981; DAVIS; YAMAMURA, 1978). Em meados desta mesma década, surgiu a hipótese glutamatérgica (GREENAMYRE; YOUNG, 1989), já a hipótese da cascata amiloide foi primeiramente proposta em 1992 (WALSH; TELOW, 2012; SELKOE, 1997).

Outras suposições foram adicionadas à hipótese amiloide ao longo da mesma década, como a hipótese de hiperfosforilação da tau (FALCO et al., 2015). A ideia mais atual demonstra uma correlação entre a DA e diabetes tipo 2, dando origem à expressão "diabetes tipo 3" (CRAFT, 2007). Entretanto, atualmente vários outros mecanismos fisiopatológicos são propostos como fatores desencadeantes da doença, mas possivelmente diferentes combinações de fatores de risco e mecanismos fisiopatológicos podem desencadear a doença em vias diferentes, porém todas levam a uma via comum, que é a neurodegeneração progressiva.

1.7.1 Hipótese colinérgica

Formulada pela primeira vez por Whitehouse et al. (1982), que evidenciaram através de seu estudo uma degeneração intensa e seletiva de neurônios colinérgicos do núcleo basal de Meynert em pacientes com DA, causando grande falha colinérgica em diversas regiões cerebrais. Essa hipótese sugere que a perda

seletiva de neurônios colinérgicos, cursa com redução da função colinérgica central, principalmente em áreas límbicas e temporoparietais, que medeiam as funções de aprendizagem e memória, e redução dos níveis de ACh que estão associadas ao declínio cognitivo (VECCHIO et al., 2021).

Entre os diferentes tipos de fármacos que podem modificar o sistema colinérgico, os inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) são aqueles que, atualmente, apresentam os melhores resultados clínicos no tratamento da doença (BIRKS, 2006; VECCHIO et al., 2021). A AChE (EC 3.1.1.7) é uma serina hidrolase que desempenha papel fundamental no sistema colinérgico, que inclui tanto o sistema nervoso central (SNC) quanto o periférico (SNP). Sua principal atividade é a catálise da hidrólise da ACh, produzindo assim íons colina e acetato, finalizando a transmissão colinérgica e impedindo o acúmulo de ACh na fenda sináptica (VECCHIO et al., 2021; THAPA; LV; XU, 2017). A inibição da AChE promove o aumento da disponibilidade de ACh no SNC, atenuando ou retardando a progressão dos sintomas associados a DA (KONDAK et al., 2022; NAIK et al., 2009; VECCHIO et al., 2021; KAASINEN et al., 2002).

1.7.2 Hipótese glutamatérgica

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante e importante do SNC, é sintetizado em neurônios e células gliais a partir de glicose e α -cetoglutarato sendo espontaneamente distribuído por todo o cérebro (CZAPSKI; STROSZNAJDER, 2021; ANDERSEN et al., 2021; WANG; REDDY, 2017). Um dos papéis mais importantes da transmissão glutamatérgica é a regulação da cognição, aprendizagem e memória através da ativação da LTP ou LTD (DANYSZ; ZAJACZKOWSKI; PARSONS, 1995; WANG; REDDY, 2017). Além do mais, está envolvido na sobrevivência neuronal e plasticidade sináptica (WANG; REDDY, 2017), dessa forma, alterações na transmissão glutamatérgica tem sido implicado na patologia de muitos distúrbios neurodegenerativos, incluindo a DA.

Em condições fisiológicas, o glutamato é liberado das vesículas sinápticas e sua atividade é mediada por 3 tipos de receptores, *N*-metil-D-Aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) e cainato, o glutamato pode ligar-se a uma subunidade do seu receptor favorecendo, em associação com a

glicina ligada a outra subunidade, a entrada de mais Ca^{2+} e Na^{+} no neurônio pós-sináptico, contribuindo para a sua excitabilidade (WANG; REDDY, 2017).

Acredita-se, portanto, que uma ativação excessiva da via glutamatérgica, por alguns fatores tais como: acúmulo do peptídeo β -amiloide solúvel, alteração do metabolismo energético celular, interrupções na depuração de glutamato e a sinalização extrassinápticos dos NMDARs, através dos astrócitos podem levar a superestimulação neuronal (OLAJIDE et al., 2021).

O aumento de Ca^{2+} intracelular é capaz de iniciar o processo de apoptose, com degeneração e morte neuronal, que é clinicamente correlacionada com alterações da cognição/memória e desenvolvimento da anatomia patológica observada em pacientes com DA (LAZAREWICZ; WROBLEWSKI; SALINSKA, 1992; ANDERSEN et al., 2021; WANG; REDDY, 2017). Deste modo, surgiu na década de 80, a hipótese glutamatérgica conhecida também como "excitotóxica" (GREENAMYRE et al., 1988).

1.7.3 Hipótese da Cascata Amiloide

Durante as últimas décadas, muitas hipóteses foram formuladas, com a finalidade de explicar e elucidar a fisiopatologia da DA. No entanto, uma característica fisiopatológica notável da doença é a presença das placas senis, formadas pelo acúmulo patológico do peptídeo $\text{A}\beta$, assim a teoria da cascata amiloide aponta que o acúmulo do peptídeo $\text{A}\beta$, produzido pela clivagem sequencial da APP, além de ser neurotóxico pode levar a formação de ENFs, disfunção neuronal, neuroinflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (GEMELLI et al., 2013; QUERFURTH; LAFERLA, 2010; LANE; HARDY; SCHOTT, 2018; JELLINGER, 2006).

Historicamente, em 1984, Glenner e Wong publicaram um estudo demonstrando a presença de um peptídeo na forma de folha torcida, chamada de fibrilas amiloides, quase exclusivamente, presente em vasos sanguíneos de cérebros dos indivíduos diagnosticados com a DA, tornando-se, na época, um marcador biológico da doença. Ademais, os autores consideraram que a grande maioria das fibrilas amiloides foram originadas a partir de clivagem proteolítica de proteínas β -amiloide, já que eles evidenciaram através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) a presença de proteínas fracionadas em dois picos, apenas nos indivíduos diagnosticados com DA.

Assim, Hardy e Higgins (1992) evidenciaram, pela primeira vez, que o peptídeo A β era de fato produto da clivagem da APP, indicaram sua neurotoxicidade e reforçaram que o peptídeo A β é o principal constituinte das placas senis. Além do mais, apresentaram a sequência de eventos que levam a formação do peptídeo A β , descrevendo a cascata patológica da DA, propondo a então conhecida hipótese da cascata amiloide.

Sabe-se, hoje, que o peptídeo A β é produzido pela clivagem proteolítica sucessiva da APP, podendo ser processada por duas vias alternativas, ilustradas na Figura 2. Na via não amiloidogênica, a APP é inicialmente clivada pela α -secretase na membrana plasmática, produzindo a proteína precursora de α -amiloide secretada (sAPP α) um peptídeo solúvel que é liberado no espaço extracelular. O peptídeo restante pode ser clivado pela γ -secretase no citoplasma, gerando dois peptídeos: domínio intracelular APP (AICD) e um produto de 3 kDa (p3), possíveis de serem depurados pelo SNC (WALSH; TELOW, 2012; GUO et al., 2021; CHEN et al., 2017; O'BRIEN; WONG, 2011; QUERFURTH; LAFERLA, 2010; THINAKARAN; KOO, 2008).

O processamento amiloidogênico da APP, que resultará na formação do peptídeo A β , é iniciado por ação da enzima β -secretase 1 (BACE1), nessa via, a APP é inicialmente clivada pela BACE1, liberando um peptídeo solúvel APP β (sAPP β), que é transportado para o meio extracelular, podendo ainda ser clivado produzindo um fragmento N-terminal da APP (N-APP). Estudos indicam que o N-APP pode iniciar a apoptose ligando-se ao receptor de morte 6, causando supressão sináptica (KIM; TSAI, 2009; GUO et al., 2021; QUERFURTH; LAFERLA, 2010; O'BRIEN; WONG, 2011; THINAKARAN; KOO, 2008).

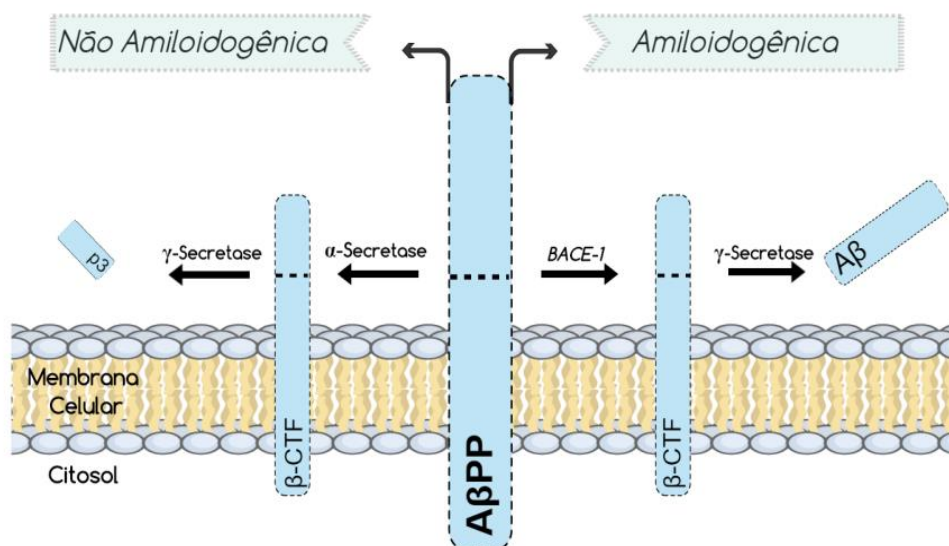
Após a clivagem por BACE1, a γ -secretase pode clivar o fragmento C-terminal remanescente da proteína precursora β -amiloide (CTF β) ligado à membrana. O CTF β então sofre fragmentação dentro de seu domínio transmembranar (TMD) pela γ -secretase que é regulada pelo complexo de proteínas enzimáticas de membrana, constituído pelas presenilinas 1 e 2 (PSEN 1 e 2), liberando o domínio intracelular da APP e peptídeos A β (FERNANDEZ et al., 2016; QUERFURTH; LAFERLA, 2010; O'BRIEN; WONG, 2011; THINAKARAN; KOO, 2008).

A clivagem de CTF β pela γ -secretase produz inúmeros e diferentes fragmentos dos peptídeos A β de comprimentos que variam de 38 a 43 resíduos de aminoácidos, mas aquelas que terminam na posição 40 (A β 40) são as mais

abundantes (~80-90%), seguidas por 42 (A β 42) (~5-10%). As formas ligeiramente mais longas de A β , particularmente A β 42, são mais hidrofóbicas, insolúveis e com maior taxa de fibrilação, sendo as principais espécies presentes dentro das placas senis depositadas no cérebro (MURPHY; LEVINE, 2010; LANE; HARDY; SCHOTT, 2018), os peptídeos A β podem sofrer degradação proteolítica através das enzimas neprilisina (NEP) e enzima de degradação da insulina (IDE) (CHEN et al., 2017; GUO et al., 2021; FERNANDEZ et al., 2016; QUERFURTH; LAFERLA, 2010; LANE; HARDY; SCHOTT, 2018; JELLINGER, 2006; O'BRIEN; WONG, 2011). O processamento de clivagem APP e seus peptídeos clivados estão resumidos na Figura 2.

Os subprodutos gerados da clivagem proteolítica da APP são um dos principais contribuintes para o mau funcionamento neuronal levando a deposição de peptídeo A β , sendo encontrado sobretudo no e neocórtex, hipocampo e sistema cerebrovascular de pacientes diagnosticados com DA (MASTERS et al., 1985; GLENNER; WONG, 1984; VISWANATHAN; GREENBERG, 2011; LANE; HARDY; SCHOTT, 2018). Os processos biológicos de formação do peptídeo A β podem ser desencadeados por mutações em genes relacionadas à doença tais como: PSEN1, PSEN2 e APP podendo influenciar o metabolismo da APP e causar DAF (LANE; HARDY; SCHOTT, 2018; JELLINGER, 2007; SCHMIDT et al., 2021) ou ser ocasionada pela homeostase anormal da APP e causar DAE (JELLINGER, 2007; SCHMIDT et al., 2021).

Figura 2. Processamento da Proteína Percursora Amiloide (APP)



Fonte: Adaptado de QUERFURTH; LAFERLA, (2010)

A clivagem da APP ocorre pela via não amiloidogênica e amiloidogênica. O local de clivagem utilizado pela γ -secretase na via amiloidogênica determina a formação predominante do peptídeo A β 40 ou o A β 42 com maior poder de agregação e neurotoxicidade. BACE-1: β -secretase; APP: proteína precursora amiloide; β -CTF: fragmento do terminal C.

1.7.4. Proteína tau e os emaranhados neurofibrilares (ENFs)

Outra característica histopatológica, marcante, da DA são ENFs, compostos principalmente de filamentos helicoidais pareados que consistem na proteína tau hiperfosforilada (SANTA-MARIA et al., 2012; BARDAI et al., 2018). Quando a proteína tau é hiperfosforilada, ela perde sua capacidade de se conectar aos microtúbulos e, em vez disso, forma polímeros com outras proteínas tau, causando aglomerados intracelulares formando filamentos helicoidais pareados, principais elementos dos emaranhados neurofibrilares (FORLENZA, 2005; CROWTHER; GOEDERT; WISCHIK, 1989; WISCHIK *et al.*, 1988; BAMBURG; BLOOM, 2009; BARDAI et al., 2018).

Fisiologicamente, em neurônios saudáveis, a proteína Tau é tipicamente solúvel e participa de vários processos biológicos, incluindo, dinâmica do citoesqueleto, transporte axonal, transmissão sináptica, transporte nuclear, além de ajudar a manter os microtúbulos que compõem o citoesqueleto (AVILA et al., 2004; TRACY et al., 2022; BARDAI et al., 2018; BODEA et al., 2016; MYEKU et al., 2016). Mas na DA essa proteína torna-se hiperfosforilada (BAMBURG; BLOOM, 2009). Isto acaba tornando-a um polímero filamentosos insolúvel, o que parece desregular a cascata citoplasmática de fosforilações e desfosforilações (BAMBURG; BLOOM, 2009; JELLINGER, 2007). Várias investigações sugeriram que o acúmulo do peptídeo A β é a causa da hiperfosforilação da proteína tau, embora os processos que causam esse desequilíbrio ainda sejam desconhecidos, já que a tauopatia pode se desenvolver independentemente das placas β -amiloide (BAMBURG; BLOOM, 2009; JELLINGER, 2007; FARRELL et al., 2022; AVILA et al., 2004). Um estudo, recente, demonstrou que a Tau é um dos principais fatores que impulsionam a neurodegeneração na DA e outras desordens neurodegenerativas (TRACY et al., 2022).

1.8 DA e resistência à insulina no SNC

Embora o papel do peptídeo A β no desenvolvimento e progressão da DA seja a teoria mais amplamente aceita, outras hipóteses sobre a origem da doença da doença têm sido propostas. Até recentemente, acreditava-se que a DA e o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) não tinham nada em comum. No entanto, uma quantidade crescente de pesquisas sugere fortemente que essas doenças têm vias fisiopatológicas em comum, e diversas pesquisas clínicas e pré-clínicas suportam a associação dessas duas condições (JANSON et al., 2004; ARNOLD et al., 2018; KANG; LEE; LEE, 2017; JOHNSON et al., 2012; NAJEM et al., 2014).

Essa ideia começou a ganhar força graças as técnicas de imagem como tomografia por emissão de pósitrons com 2-[¹⁸F]-fluoro-2-desoxi-D-glicose (18F-FDG), tomografia funcional e ressonância magnética, que revelaram alterações no metabolismo da glicose no cérebro de indivíduos com DA, como uma possível explicação para a doença (LU et al., 2016; HOYER, 1998). De acordo com essas pesquisas, a diminuição do consumo de glicose no cérebro pode ser um sinal muito precoce da DA. Medições com a técnica de 18FDG-PET em indivíduos portadores dos genes de DA mostraram sinais de captação de glicose cerebral diminuída, aparentemente independentes de atrofia estrutural, que podem ser detectáveis até três décadas antes do início esperado de sintomas clínicos de DAF e DAE (MOSCONI et al., 2006).

Estudos mostram que pessoas com DM2 são mais propensas a desenvolver a DA (ARVANITAKIS et al., 2004; XU et al., 2007). Ademais, o cérebro é o órgão com maior probabilidade de demonstrar deficiência na sinalização da insulina com o envelhecimento (COLE; FRAUTSCHY, 2007; STEEN et al., 2005), já que a glicose é a sua principal fonte de combustível (HOWARTH; GLEESON; ATTWELL, 2012). Assim, os cientistas começaram a investigar as conexões moleculares entre essas doenças, sendo a insulina o elo mais intrigante.

Insulina e fatores de crescimento como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fatores de crescimento semelhantes à insulina 1 e 2 (IGF-1 e 2) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) enviam o sinal intracelular para a sobrevivência neuronal e alteram o metabolismo de proteínas que estão envolvidas no desenvolvimento da DA (KOWIASKI et al., 2018; ARNOLD et al., 2018). Estudos realizados em laboratório mostraram que a insulina desempenha um papel anti-

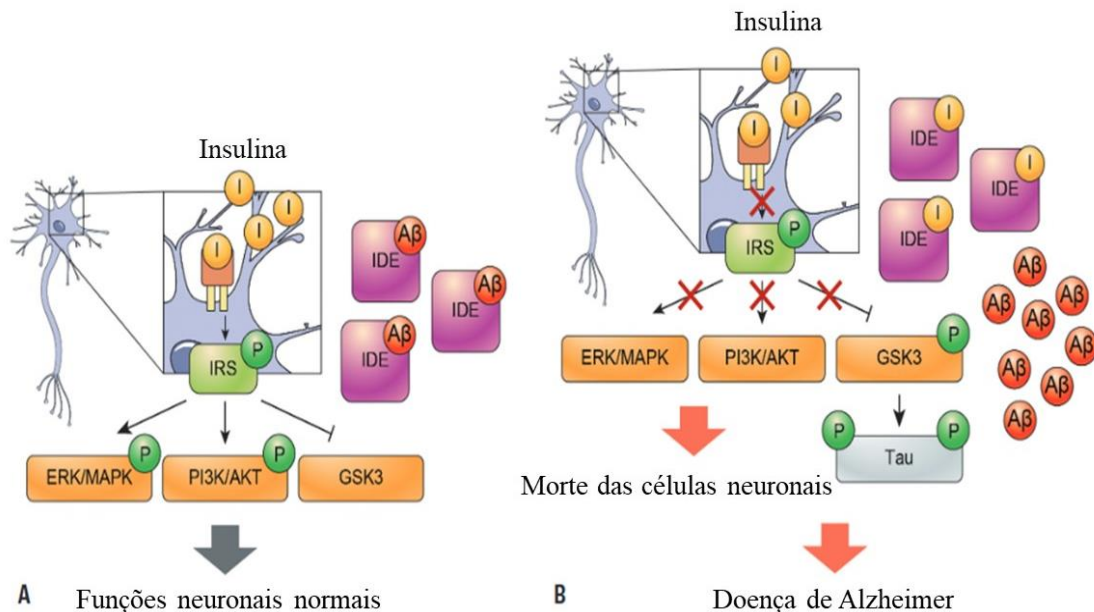
apoptótico no córtex cerebral, contribui para o crescimento, diferenciação, neurogêneses, regeneração e proliferação de neurônios e modifica as concentrações de vários neurotransmissores, incluindo acetilcolina (PLUM; SCHUBERT; BRÜNING, 2005; WATSON; CRAFT, 2004; ARNOLD et al., 2018; HOYER, 2000).

A insulina é produzida localmente em certas regiões do cérebro, como hipocampo, córtex pré-frontal, córtex entorrinal e bulbo olfatório, embora maior parte da insulina no cérebro deriva da insulina pancreática e entra no cérebro principalmente por meio de transporte seletivo e saturável através das células endoteliais capilares da barreira hematoencefálica (BHE) (BANKS, 2004; CSAJBÓK; TAMÁS, 2016; DORN et al., 1982).

Os múltiplos efeitos biológicos da insulina são causados por sua capacidade de se ligar e ativar as subunidades α extracelulares do receptor de insulina (IR), levando à dimerização e autofosforilação das subunidades intracelular β e ativação de sua atividade quinase, que por sua vez causa a fosforilação de resíduos de tirosina em proteínas intracelulares conhecidas com substrato receptor de insulina (IRS). Em seguida, o IRS estimula vias como a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K/Akt), ambas essenciais para atividades mitogênicas e metabólicas, e causa desfosforilação da glicogênio sintase quinase-3 GSK3 β e GSK3 α , respectivamente, inibindo sua atividade enzimática por bloquear uma porção de seu sítio ativo (ARNOLD et al., 2018; WEI; KOYA; REZNIK, 2021; KANG; LEE; LEE, 2017; PLUM; SCHUBERT; BRÜNING, 2005; SUN et al., 2020). Estudos mostraram que a atividade da GSK3 β , embora, não seja a principal causa de demência, ela aumenta a produção de A β , hiperfosforilação de Tau e degeneração neuronal (Figura 3) (KANG; LEE; LEE, 2017).

A enzima degradante de insulina (IDE) é conhecida por degradar o excesso de insulina e outros peptídeos, incluindo o peptídeo A β (KANG; LEE; LEE, 2017). Um estudo mostrou que Camundongos *knockout* de IDE exibem acúmulo de A β , aumento de insulina circulante e hiperglicemia, quando IDE estar ocupada com excesso de insulina, ela não pode degradar A β , favorecendo à formação de placas senis e hiperfosforilação da tau (FARRIS et al., 2003).

Figura 3. Visão geral do sistema de sinalização de insulina e as vias associadas implicadas na DA.



Fonte: Adaptado de KANG; LEE; LEE (2017).

A sinalização da insulina mantém as funções neuronais normais através dos sinais IRS, ERK/MAPK, PI3K/AKT e GSK3 (A). A resistência à insulina no cérebro diminui a transdução do sinal de insulina, levando à morte das células neuronais e à DA (B). IRS, substrato do receptor de insulina; ERK/MAPK, quinase extracelular relacionada ao sinal/proteína quinase ativada por mitógeno; vias PI3K/AKT, PI3 quinase/Akt; GSK3, glicogênio sintase quinase-3; IDE, enzima degradante de insulina; Aβ, beta-amiloide.

A condição conhecida como DM2 é caracterizada por "sensibilidade reduzida nos tecidos do corpo à ação da insulina", que é a definição de resistência à insulina. Da mesma forma, a resistência à insulina no cérebro pode ser definida como a incapacidade das células cerebrais de responder à insulina. Atualmente, identificada como resistência à insulina cerebral, muitas vezes referida como "diabetes tipo 3" (KANG; LEE; LEE 2017; STEEN et al., 2005; MICHAILIDIS et al., 2022; STEEN et al., 2005).

Em nível cerebral os IRs são encontrados em todos os tipos de células, embora haja uma heterogeneidade significativa em seus níveis de expressão entre as áreas (ARNOLD et al., 2018; PLUM; SCHUBERT; BRÜNING, 2005; WEI; KOYA; REZNIK, 2021). O bulbo olfativo, hipotálamo, hipocampo, córtex cerebral, corpo estriado e cerebelo têm a maior densidade de receptores de insulina no cérebro (MARKS et al., 1990; WEI; KOYA; REZNIK, 2021).

Adicionalmente, evidências crescentes sugerem que a resistência à insulina no cérebro contribui para o desenvolvimento da DA (CRAFT, 2007). Existe uma correlação entre resistência à insulina, atrofia cerebral e déficits cognitivos em idosos (CRANE et al., 2013). Da mesma forma, a sinalização da insulina é especialmente crucial para o aprendizado e a memória (CHIU et al., 2008).

A insulina foi supostamente um dos primeiros medicamentos utilizados no tratamento de doenças psiquiátricas, de acordo com relatos históricos (JONES, 2000). Nos últimos tempos, houve um aumento substancial no interesse dos pesquisadores nos efeitos terapêuticos da insulina para o tratamento de distúrbios cognitivos. Isso se deve principalmente aos resultados excepcionais positivos dos ensaios clínicos realizados com "insulina inalada" (BENEDICT et al., 2007; CRAFT, 2012). Além disso, há evidências de estudos de neuroimagem indicando que a injeção intranasal de insulina aumenta a perfusão cerebral, a conexão inter-hemisférica e a capacidade cognitiva, o que indica que essa terapia pode ser útil para pessoas que sofrem com DA (NOVAK et al., 2014; CRAFT, 2012; BENEDICT, 2004).

1.9 Tratamento farmacológico da DA

Os inibidores das colinesterases são as principais drogas hoje licenciadas para o tratamento específico da DA, galantamina, donepezil e rivastigmina são inibidores seletivos e reversíveis da AChE, atualmente as drogas mais promissoras em termos de benefícios clínicos, e têm sido escolhidas para o tratamento atual da DA (FORLENZA, 2005; VECCHIO et al., 2021; JANN, 2000; BIRKS, 2006; BIRKS; HARVEY, 2006; VECCHIO et al., 2021). Essa nova geração de inibidores é relativamente bem aceita e possui um regime de dosagem mais rígido (BIRKS, 2006). Apesar disso, estudos clínicos relataram alguns efeitos adversos como náusea, vômito, diarreia, perda de peso, insônia, alterações no sono, espasmos musculares, bradicardia, desmaio e fadiga (BIRKS, 2006).

Outra droga usada clinicamente é a memantina, um antagonista não-competitivo do receptor NMDAR, é usada no tratamento sintomático e neuroprotetor da DA (MATSUNAGA et al., 2018; KISHI et al., 2017; OLAJIDE et al., 2021). No entanto, deve-se notar que embora haja uma melhora transitória do estado funcional

do paciente, os efeitos das medicações agora licenciadas para o tratamento da DA restringem-se a retardar a evolução dos sintomas.

Notavelmente, em 7 de junho de 2021, o FDA aprovou o Aducanumab, o primeiro anticorpo para o tratamento da DA que diminui as placas amiloides (GREICIUS, 2021; TERAQ; HONYASHIKI; INOUE, 2022). No entanto, uma revisão preliminar de ensaios clínicos revelou que não houve aumento significativo na capacidade mental dos pacientes com declínio cognitivo leve e sugeriu ensaios clínicos mais precisos de fase IV, para confirmar seus efeitos (KNOPMAN; JONES; GREICIUS, 2021). Além disso, não há dados sobre a segurança ou eficácia de iniciar o tratamento em estágios iniciais ou posteriores da doença, além do elevado custo, em aproximadamente US\$ 28.000 por um ano, por pessoa (DHILLON, 2021; KNOPMAN; JONES; GREICIUS, 2021; (TERAQ; HONYASHIKI; INOUE, 2022).

1.10 Neuroinflamação

A neuroinflamação é uma defesa endógena eficaz que protege o SNC e restaura a homeostase. No entanto, eventos neuroinflamatórios prolongados podem levar ao dano neuronal gradual como em muitos distúrbios neurodegenerativos (FUSTER-MATANZO et al., 2013; SIMPSON et al., 2010). O sistema imunológico do cérebro é composto principalmente de micróglia e astrócitos, que desempenham um papel importante no processo de neuroinflamação (PARK; BOWERS, 2010; ONYANGO et al., 2021; DHAPOLA et al., 2021). O processo neuroinflamatório é um achado significativo no cérebro *post-mortem* de indivíduos com DA, e está relacionada com astrogliose e microgliose reativa (SERRANO-POZO et al., 2013), bem como com a expressão elevada de citocinas pró-inflamatórias (SWARDFAGER et al., 2010). Vários outros estudos evidenciaram que os cérebros de pacientes com DA exibem proliferação microglial e ativação de múltiplos processos inflamatórios, indicando que a neuroinflamação desempenha um papel importante na gênese da DA (ZHENG; ZHOU; WANG, 2016; SOLANA; TARAZONA; SOLANA, 2018; PUGAZHENTHI; QIN; REDDY, 2017; ONYANGO et al., 2021).

Adicionalmente, em uma revisão recente Ahmad et al. (2022) evidenciaram que quando estimuladas, as células da micróglia desencadeiam respostas neuroinflamatórias liberando substâncias pró-inflamatórias que incluem: interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), fator de necrose tumoral-alfa (TNF α) e quimiocinas como, receptor

de quimiocina C-C tipo 3 (*CCR3*), ligante de quimiocina 2 (*CCL2*) e receptor CC-quimiocina 5 (*CCR5*), fatores de transcrição como fator nuclear kappa B (NF- κ B) e peptídeos (bradicinina), bem como ERO e ERN, produzindo uma resposta inflamatória prolongada que em algumas circunstâncias favorece o processo de neurodegeneração neuronal.

É importante notar, que moléculas pró-inflamatórias podem iniciar uma série de cascatas de sinalização, facilitando a ativação da caspase-8, enzima associada à apoptose e neurodegeneração, resultando em diminuição da LTP, aumento da síntese do peptídeo A β , indução de óxido nítrico (NO), NF- κ B, ativação de micróglia e astrócitos, fosforilação de tau, disfunção sináptica e diminuição da respiração celular (LYMAN et al., 2014; ZHENG; ZHOU; WANG, 2016; WEI; KOYA; REZNIK, 2021; PUGAZHENTHI; QIN; REDDY, 2017).

A neurotoxicidade gerada pelo peptídeo A β está relacionada com a ativação microglial prolongada, o que acaba resultando em um aumento na produção de mediadores pró-inflamatórios (MINTER; TAYLOR; CRACK, 2016; ALASMARI et al., 2018). De fato, níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias e marcadores de gliose foram observados tecido em cerebral de pacientes com DA (PERRY; NICOLL; HOLMES, 2010; AGUZZI; BARRES; BENNETT, 2013). Numerosos estudos apontam a presença de altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-18 no soro e o líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com DA (SWARDFAGER et al., 2010; SCHUITEMAKER et al., 2009; LYMAN et al., 2014; ZHENG; ZHOU; WANG, 2016; WEI; KOYA; REZNIK, 2021; NG et al., 2018).

Um estudo revelou que TNF- α é liberado principalmente pela micróglia no cérebro em resposta a trauma, infecção ou estresse celular causado pela formação e agregação do peptídeo A β (PARK; BOWERS, 2010) e tanto pacientes com DA quanto modelos animais transgênicos da doença apresentaram níveis elevados dessa citocina no LCR e no cérebro (JIN et al., 2008; SWARDFAGER et al., 2010). A presença de TNF- α em pacientes com comprometimento cognitivo leve indica, mais uma vez, que a inflamação no SNC é uma característica precoce da patogênese da DA (TARKOWSKI, 2003).

Adicionalmente, a resistência à insulina provoca a ativação da isoforma GSK-3 β , que por sua vez, desempenha vários papéis na modulação da neuroinflamação, incluindo a diminuição da integridade do BHE, a diminuição do

clearance do peptídeo A β , a hiperfosforilação da tau e a regulação favorável da produção de TNF- α via NF- κ B (KANG; LEE; LEE, 2017; WEI; KOYA; REZNIK, 2021; LYMAN et al., 2014; PUGAZHENTHI; QIN; REDDY, 2017; ZHANG et al., 2018). Além disso, foi demonstrado que citocinas inflamatórias, particularmente TNF- α e IL-6, podem levar a resistência à insulina, enquanto a citocina anti-inflamatória como IL-4 podem estimular a sensibilidade à insulina (ZHENG; ZHOU; WANG, 2016).

Segundo estudos, a resistência à insulina no cérebro também promove a síntese de substâncias químicas pró-inflamatórias. Os produtos finais de glicação avançada (AGEs) gerados pela hiperglicemia e pela resistência à insulina causam danos teciduais significativos, que por sua vez induzem uma resposta inflamatória no SNC (PUGAZHENTHI; QIN; REDDY, 2017; WEI; KOYA; REZNIK, 2021). Em cérebros de ratos diabéticos, foram detectados níveis aumentados de dois biomarcadores para AGEs, a pentosidina e piridínio derivado de gliceraldeído (GLAP), além de que verificou-se que a pentosidina e GLAP também induzem a expressão de BACE1, uma enzima chave na geração de A β pela ativação de NF- κ B. (GUGLIELMOTTO et al., 2012). Pacientes com alto risco de desenvolver DA apresentaram quantidades elevadas de AGEs no sangue e no cérebro, e isso estaria relacionado a um ritmo mais rápido de deterioração cognitiva (BEERI et al., 2011). De um modo geral, essas ocorrências iniciam um ciclo de disfunção que resulta em neurodegeneração.

1.11 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é a condição que ocorre quando a criação de ERO e ERN, incluindo ânion radical superóxido (O $_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H $_2$ O $_2$), radical hidroxila ($\cdot$ OH), ON e peroxinitrito (ONOO $^-$) superam drasticamente a capacidade de defesa e reparo antioxidante do corpo, resultando em danos aumentados as biomoléculas, como ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, induzindo à necrose ou à apoptose (HALLIWELL, 2006; HENSLEY et al., 2002; TÖNNIES; TRUSHINA, 2017; RAY; HUANG; TSUJI, 2012; UTTARA et al., 2009; HUANG et al., 2016).

Nesse contexto, o estresse oxidativo tem sido identificado como um componente que contribui para o processo de envelhecimento, bem como para a progressão de uma série de doenças neurodegenerativas, incluindo a DA (TÖNNIES; TRUSHINA, 2017). A manifestação do estresse oxidativo na DA deve-se à presença

de altos níveis de proteínas oxidadas, AGEs, peroxidação lipídica, formação de espécies tóxicas como peróxidos, álcoois, aldeídos, carbonilas livres, cetonas e colesteno e modificações oxidativas no ácido Desoxirribonucleico (DNA) nuclear e mitocondrial, que podem contribuir para a progressão da doença (GELLA; DURANY 2009; GEMELLI et al., 2013).

Por exemplo, os níveis de proteína carboniladas (PCs), se mostraram aumentados em áreas do cérebro com alta concentração de peptídeo A β , em pacientes com DA (HENSLEY et al., 2002). Outros estudos mostraram a presença de marcadores sanguíneos de estresse oxidativo em pacientes com DA e em modelos animais transgênicos (APP/PS1), incluindo 3-nitrotirosina, 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG), 8-hidroxiguanosina (8-OHG), malondialdeído (MDA), 4-hidroxinonenal (4-HNE) e F2-isoprostanos (F2-IsoPs) (BISHT; SHARMA; TREMBLAY, 2018; AGRAWAL; JHA, 2020; HUANG et al., 2016; GELLA; DURANY, 2009; TORRES et al., 2011; PADURARIU et al., 2010; GEMELLI et al., 2013; CARNEY 2006). Além disso, estudos prévios revelaram que o processo neuroinflamatório crônico, causado pela presença das placas amiloides gera superativação microglial, compromete as funções mitocondriais, acentua o processo de neurodegeneração e contribui para a produção e síntese amplificada de ERO (SIMPSON; OLIVER, 2020).

Estudos têm mostrado a resistência de insulina como fator agravante do estresse oxidativo, podendo tornar os neurônios energeticamente defeituosos e suscetíveis à oxidação ou outros insultos metabólicos que prejudicam a plasticidade sináptica (BUTTERFIELD et al., 2014).

Mudanças no metabolismo da glicose ligada à disfunção mitocondrial precoce, encontradas em modelos animais transgênicos com superexpressão de APP murino (mAPP), cultura de células e pacientes com DA, demonstraram ser uma causa direta de estresse oxidativo e disfunção sináptica, afetando as membranas sinápticas e modificando processos sinápticos importantes para o aprendizado e a memória (TÖNNIES; TRUSHINA, 2017; DU et al., 2010). Considera-se que essas alterações no metabolismo da glicose são processos precoces da doença, pois ocorrem antes de qualquer indício da doença ou da existência do peptídeo A β e proteína Tau (BEAL, 2005; DU et al., 2010; REDDY, 2011; YAO et al., 2009; CARDOSO et al., 2004).

Cérebro e os tecidos nervosos são mais vulneráveis ao dano oxidativo devido ao alto fluxo de cálcio para os neurônios, à presença de neurotransmissores excitatórios, principalmente glutamato, e à alta taxa de consumo de oxigênio molecular

(O₂) pelos tecidos nervosos (HALLIWELL, 2006). Além disso, a maior parte da energia livre necessária para alimentar a maioria das reações celulares no cérebro é produzida pela oxidação aeróbica da glicose, e a maioria desses processos metabólicos ocorre nas mitocôndrias (BEAL, 2005). Portanto, o mau funcionamento mitocondrial pode causar neurodegeneração e contribuir para o desenvolvimento da DA.

Dados crescentes apoiam a ideia de que a falha mitocondrial nos neurônios é considerada um elemento crucial em todas as doenças neurodegenerativas, incluindo a DA (BUTTERFIELD et al., 2014). Sabe-se que as mitocôndrias são os coordenadores centrais do metabolismo energético e são fontes e alvos de ERO, durante a fosforilação oxidativa, formando H₂O₂ e O₂ – que são produzidos como subprodutos nas mitocôndrias principalmente pelos complexos I e III (RAY; HUANG; TSUJI, 2012; QUINLAN et al., 2013).

Em condições normais, as enzimas antioxidantes que atuam como sequestradores de radicais livres equilibram os níveis de ERO. Estas incluem superóxido dismutases (SOD), glutathione peroxidase (GPX), glutarredoxinas, tioredoxinas e catalase (CAT) (QUINLAN et al., 2013) e o equilíbrio entre a geração de ERO e a defesa antioxidante é crucial para manter a homeostase redox celular. No entanto, na DA, a atividade das enzimas antioxidantes está prejudicada, contribuindo para o acúmulo desenfreado de dano oxidativo (KIM et al., 2006).

Em apoio a essa teoria, foram encontrados marcadores de estresse oxidativo, como altos níveis de proteínas oxidadas, produtos glicosilados, extensa peroxidação lipídica e modificações oxidativas no ácido ribonucleico (RNA) e no DNA nuclear e mitocondrial em tecido cerebral *post-mortem* de pessoas com DA e portadores do gene da ApoE4 em fases iniciais da doença (RAMASSAMY et al., 2000), em modelos de camundongos portadores de ApoE4 e em culturas de células mitocondriais (SULTANA et al., 2011; BUTTERFIELD; DI DOMENICO; BARONE, 2014; HUANG et al., 2016; PRATICÒ, 2008; RAMASSAMY et al., 2001). Além disso, a peroxidação lipídica das membranas mitocondriais pode impactar negativamente a dinâmica e a funcionalidade da organela, o que pode diminuir o fornecimento de energia em locais sinápticos.

1.12 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e DA

Membro da família das neurotrofinas, o BDNF é uma proteína endógena e é o fator de crescimento mais abundante no SNC. É crucial para a sobrevivência neuronal, crescimento e orientação de axônios e dendritos, plasticidade sináptica, LTP, liberação de neurotransmissores e desenvolvimento e diferenciação de novos neurônios e sinapses (AMIDFAR et al., 2020; HUANG; REICHARDT, 2001). O BDNF está presente em altas concentrações em regiões do cérebro humano, como hipocampo, hipotálamo, córtex e cerebelo, e desempenha um papel significativo nas na aprendizagem, memória e funções cognitivas (BEKINSCHTEIN et al., 2008; MURER, YAN; RAISMAN-VOZARI 2001).

O Pro-BDNF é a forma precursora do BDNF originalmente produzida; esse precursor é posteriormente clivado pela enzima plasmina para produzir BDNF maduro (mBDNF) (KOWIASKI et al., 2018). O pró-BDNF e o mBDNF têm efeitos diferentes na atividade neuronal porque se ligam a diferentes receptores e ativam diferentes vias de sinalização. O pró-BDNF interage com o pan receptor de neurotrofinas (p75. NTR), enquanto o mBDNF liga-se com grande afinidade ao receptor tirosina quinase B (TrkB) (p75). Isso resulta em atividades antagônicas. Enquanto o pró-BDNF causa retração dendrítica, LTD e morte, o mBDNF promove o desenvolvimento dendrítico, sobrevivência celular e LTP (KOWIASKI et al., 2018; GAO et al., 2022).

O receptor TrkB é dimerizado e autofosforilado quando o BDNF se liga a ele. Como resultado, as cascatas de sinalização, como as cascatas MAPK/ERK e PI3K/Akt são ativadas. O alvo a jusante desse mecanismo, o CREB, promove a transcrição de genes necessários para a sobrevivência e desenvolvimento dos neurônios, incluindo o BCL-2, que tem efeito antiapoptótico ao inibir a liberação do citocromo C (KOWIASKI et al., 2018; AMIDFAR et al., 2020; LIMA GIACOBBO et al., 2019). A interação entre pró-BDNF e p75NTR induz a apoptose através da cascata JNK. O NF- κ B ativado promove a expressão do gene β -secretase 1 (BACE1), seguido pela superexpressão da proteína BACE1 e aumento da atividade da enzima BACE1, gerado o peptídeo A β a partir de APP. Por sua vez, o peptídeo A β inibe a expressão de TrkB, levando à neurodegeneração (GAO et al., 2022).

Evidências crescentes sugerem que a fisiopatologia da DA é influenciada pela diminuição dos níveis de BDNF. Por exemplo, o hipocampo, o córtex temporal e o córtex frontal de pacientes com DA demonstraram exibir significativamente menos

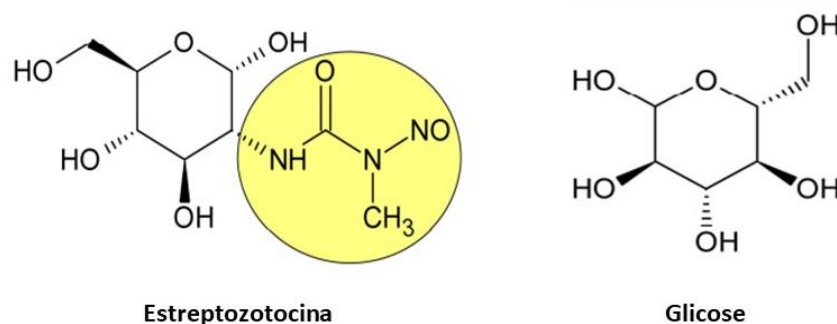
RNA mensageiro (mRNA) e proteína BDNF (CONNOR et al., 1997; HOCK et al., 2000). Esses resultados sugerem a possibilidade de que a expressão diminuída de BDNF pode contribuir para a progressão da morte celular na DA.

1.13 Modelo experimental de DAE por injeção intracerebroventricular de estreptozotocina (STZ)

Dado o histórico de anormalidades na sinalização da insulina e no metabolismo da glicose na DA, pesquisadores começaram a usar injeções intracerebroventriculares de STZ (ICV-STZ) como modelo experimental da doença. Este modelo foi proposto pela primeira vez pelo professor Sigfried Hoyer em 1994, com objetivo de produzir um estado de resistência à insulina no cérebro usando doses subdiabetogênicas até 100 vezes menores do que as usadas periféricamente (HOYER; MÜLLER; PLASCHKE, 1994; DUELLI et al., 1994; GRIEB, 2016).

A STZ (Figura 4) é uma glucosamina-nitrosoureia de ocorrência natural gerada pela bactéria Gram-positiva *Streptomyces acromogenes* (EILEEN DOLAN, 1997). Com exceção de uma única hidroxila em C2 sendo substituída por um grupo nitrosoureia, sua estrutura molecular é muito semelhante à da glicose. Devido a essa semelhança, a STZ pode entrar na célula pelo transportador de glicose 2 (GLUT 2) (KAMAT et al., 2016; GRIEB, 2016).

Figura 4. Estruturas químicas da estreptozotocina e glicose.



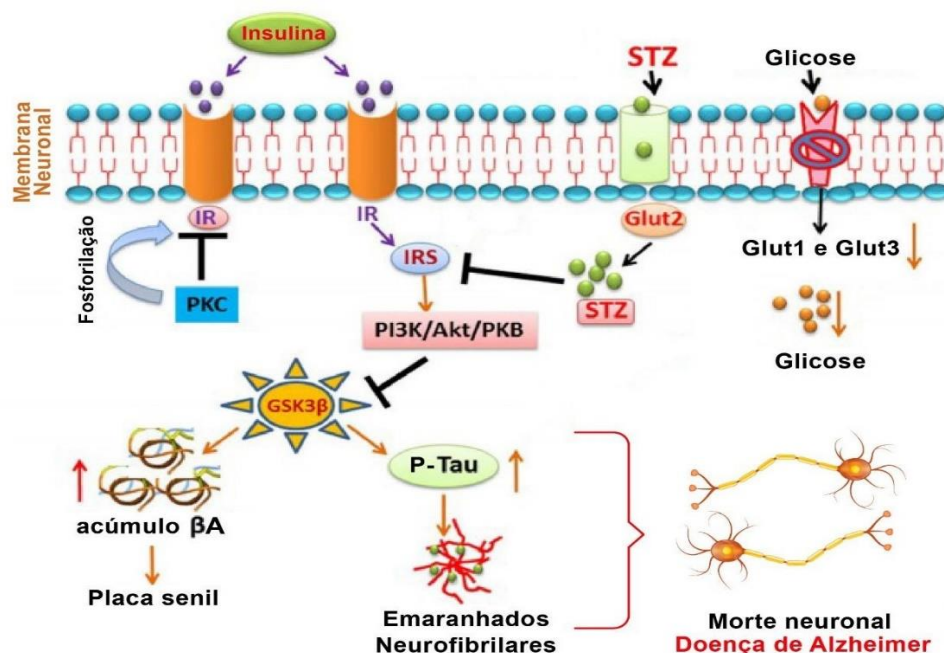
Fonte: Adaptado de GOYAL et al. (2016)

Por reduzir o metabolismo da glicose no cérebro e a resposta à insulina, a STZ pode gerar comprometimento cognitivo e alterações cerebrais comparáveis às observadas em pacientes com DA, como redução da transmissão colinérgica,

neuroinflamação e dano oxidativo (KAMAT et al., 2016; GRIEB, 2016). A STZ é frequentemente injetada intraperitonealmente em camundongos experimentais para induzir diabetes, afetando as células produtoras e secretoras de insulina não atravessando a barreira hematoencefálica (SZKUDELSKI, 2001; KONRAD et al., 2001).

Em nível cerebral, a injeção de STZ diminui a expressão do receptor de insulina e a atividade da via de sinalização PI3K/Akt, causando disfunções no sistema de sinalização de insulina do cérebro, que leva a um aumento na atividade da GSK3- β , fosforilação da proteína tau e elevação dos níveis de peptídeo β -amiloide (KAMAT et al., 2016; GRIEB, 2016; KAMAT, 2015). Na Figura 5, vemos o mecanismo de ação da STZ. Já foi demonstrado que injeções ICV-STZ tem um impacto negativo precoce no desempenho cognitivo de animais avaliados no teste de reconhecimento de objetos (14 e 21 dias após a injeção). Esses efeitos foram seguidos por um aumento significativo nos níveis de peptídeo β -amiloide e fosforilação Tau, bem como diminuição dos níveis de expressão de sinapsina (RAVELLI et al., 2017). Esses processos anormais resultam na degeneração das sinapses e, eventualmente, na morte dos neurônios.

Figura 5. Visão geral do sistema de sinalização de insulina e as vias associadas implicadas na DA



Fonte: Adaptado de Kamat et al. (2015).

A membrana contém o transportador de glicose GLUT2, o que facilita a entrada de STZ. Depois de entrar nas células, STZ suprime a via de sinalização PI3K e AKT através do comprometimento da

sinalização do receptor de insulina (IRS). A inibição de PI3K e AKT, gera desinibição da regulação da GSK-3 β , resultando em um aumento da sua atividade, o que facilita a acumulação de A β e a hiperfosforilação de Tau. O acúmulo de A β estimula o desenvolvimento da placa senil, enquanto a hiperfosforilação da tau estimula o desenvolvimento de emaranhados neurofibrilares, uma marca registrada da DA. Por outro lado, as proteínas quinases B e C bloqueiam a ação normal da insulina nos neurônios pela hiperfosforilação do receptor de insulina (IR), prejudicando a entrada de glicose na célula.

1.14 Neuroproteção e compostos naturais

O potencial terapêutico das substâncias químicas naturais para o tratamento e prevenção das doenças neurodegenerativas tem sido objeto de muita pesquisa. Há evidências crescentes que dietas à base de vegetais, como a dieta mediterrânea, que inclui uma ampla variedade de frutas, vegetais, legumes, nozes e grãos integrais, com compostos bioativos como vitaminas antioxidantes, polifenóis e outros fitoconstituintes e os ácidos graxos insaturados podem ajudar a proteger o cérebro (ROMÁN et al., 2019).

Um estudo prospectivo realizado no período de 2004 a 2014 com 960 participantes do Projeto Memória e Envelhecimento, com idades entre 58 e 99 anos, revelou que comer cerca de uma porção por dia de vegetais de folhas verdes e alimentos ricos em filoquinona, luteína, nitrato, folato, α -tocoferol e flavonoides podem ajudar a retardar o declínio cognitivo (MORRIS et al., 2018).

Heo e Lee. (2005) revelam que os constituintes do morango, banana e laranja têm um potencial antioxidante muito forte contra a neurotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio em células PC12. Este potencial antioxidante pode ser atribuído ao alto teor de compostos fenólicos como antocianinas, ácido gálico, taninos, vitamina C, vitamina E e carotenóides. Em conformidade, ensaios clínicos randomizados mostram que alimentos vegetais como frutas cítricas, uvas, frutas vermelhas, cacau, nozes, chá verde, café e ácidos graxos como ômega-3 podem melhorar a cognição de pacientes com DA retardando o declínio e o processo de neurodegeneração (HERNANDO-REQUEJO, 2016; ROMÁN et al., 2019).

O resveratrol, um polifenol encontrado principalmente em sementes de uva, vinho tinto e casca de amendoim, reduziu significativamente a atividade da AChE no córtex cerebral e melhorou o comprometimento cognitivo de ratos diabéticos (CHMATZ et al., 2009). Compostos flavonoides polifenólicos oriundos de plantas podem exercer efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos no corpo humano e são amplamente reconhecidos como tendo um impacto substancial no tratamento e

prevenção de uma variedade de doenças neurodegenerativas, incluindo DA, epilepsia, doença de Parkinson (PACHECO et al., 2018; DADHANIA et al., 2016; DIVINO DA ROCHA et al., 2011).

Venigalla e colaboradores (2016) forneceram uma visão geral dos efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios; antiamiloidogênicos; neuroprotetores e de aprimoramento da cognição de uma variedade de nutracêuticos, incluindo curcumina, apigenina, ácido docosahexaenóico, epigallocatequina galato, ácido α -lipóico e resveratrol, e seu potencial na prevenção e tratamento da DA.

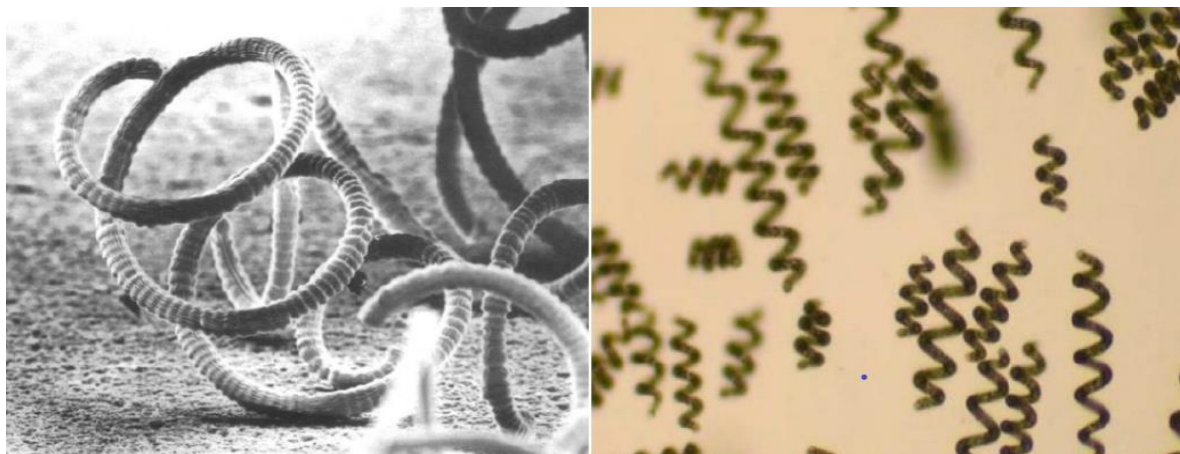
As vitaminas oriundas de frutas, vegetais e legumes podem prevenir o comprometimento cognitivo e exercer efeitos aditivos no cérebro, especialmente o ácido fólico, vitamina B12, B6, C, E, A, D, K, β -caroteno (HERNANDO-REQUEJO, 2016). De fato, estudos *in vitro* já demonstraram que a vitamina A e β -caroteno inibem a oligomerização de A β 40 e A β 42 (ONO; YAMADA, 2012).

Em estudos anteriores *in vivo*, injeções intraperitoneais de vitamina A diminuíram a deposição de A β e fosforilação de tau em modelos de camundongos transgênicos de DA, atenuando a degeneração neuronal e melhorando aprendizado espacial e memória (ONO; YAMADA, 2012). Outro estudo demonstrou que a administração de β -caroteno aliviou a perda cognitiva em um modelo de DAE induzido por STZ, por meio de sua ação antioxidante, supressão da AChE e diminuição dos fragmentos da proteína β -amiloide (HIRA et al., 2019).

1.15 *Spirulina platensis* (SPI)

Arthrospira, também conhecida como *Spirulina*, é um gênero de microorganismos unicelulares azul-esverdeados que são membros do filo Cyanobacteria, pertencente ao domínio *Bacteria* (Figura 6). Possui propriedades tanto de células vegetais (presença de clorofila, fotossíntese e parede celular à base de celulose) quanto de bactérias (material nuclear disperso no citoplasma) (ELFAR et al., 2022; ECYCLE, 2019). Cerca de 58 espécies de espirulina são conhecidas, mas *Spirulina platensis* (SPI) e *S. maxima* são as mais conhecidas e produzidas em laboratório (OLIVEIRA et al., 2013; BORTOLINI et al., 2022).

Figura 6. Imagens microscópicas capturadas da *Spirulina platensis*



Fonte: ELFAR et al. (2022)

A *Spirulina* foi descoberta em lagoas de água doce na África e na América Latina, e está se tornando cada vez mais popular em muitas partes do mundo devido à sua adaptabilidade a uma ampla gama de condições ambientais, incluindo meio alcalino, ambientes salinos, alta temperatura e muita luz (TROTТА et al., 2022). Por ser extremamente adaptável ao ambiente, mesmo quando sujeita a condições extremas, o que levou ao cultivo e consumo generalizado em várias partes do mundo. Por sua alta concentração de nutrientes e efeitos anti-inflamatórios, é um dos suplementos naturais mais completos atualmente disponíveis. Como resultado, inúmeras empresas estão cultivando essa cianobactéria para uso comercial e seus produtos são vendidos como suplementos nutricionais no mercado (ANDRADE; COSTA, 2008; LUPATINI et al., 2017; TROTТА et al., 2022; EL BAKY; EL BAROTY; MOSTAFA, 2020; WU et al., 2016).

No Brasil, o pesquisador Jorge Alberto Vieira Costa encontrou uma espécie de *Spirulina* chamada *Arthrospira platensis*. Seu habitat natural é a Lagoa Mangueira, que fica entre a Lagoa dos Patos e o Oceano Atlântico no Rio Grande do Sul (JONH, 2016). No semiárido nordestino paraibano, existem campos de cultivo criados em cisternas com capacidade para até 15 mil litros de água. As águas salinas do subsolo, o baixo custo, as altas temperaturas da região e os altos índices de insolação contribuem para o sucesso desse cultivo (ECYCLE, 2019). Além disso, existem empresas que cultivam a espirulina com fins lucrativos, e a área de cultivo desse produto está se expandindo em diversas localidades.

O extrato aquoso da SPI possui grandes quantidades de constituintes bioativos, destacando-se pela presença vitaminas essenciais, minerais e ácidos graxos poli-insaturados, em particular, o ômega-6 (ω 6) e ômega-3 (ω 3), além dos compostos fenólicos que conferem benefícios nutricionais a essa espécie (EL BAKY; EL BAROTY; MOSTAFA, 2020; GUTIÉRREZ-SALMEÁN et al., 2015; ELFAR et al., 2022; ALFADHLY et al., 2022). Ademais, possui um alto teor de proteína de 55-71%, 15-25% de carboidratos e um teor de gordura de 6-12 % (GUTIÉRREZ-SALMEÁN et al., 2015; ELFAR et al., 2022), representados na Tabela 1.

Tabela 1. Constituintes bioativos da SPI

CONTEÚDO	QUANTIDADE/ UNIDADE
CARBOIDRATOS	15-25 %
PROTEÍNAS	65,0-71 %
AMINOÁCIDOS	Alanina (7,7-46,6 mg/g); Arginina (7,9-47,6 mg/g); Ácido Aspártico (12,1-72,8 mg/g); Cisteína (0,9-5,6 mg/g); Ácido glutâmico (4,1-84,4 mg/g); Glicina (5,3-31,9 mg/g); Histidina (2,5-15,0 mg/g); Isoleucina (5,4-32,6 mg/g); Leucina (8,2-48,9 mg/g); Lisina (4,4-26,2 mg/g); Metionina (2,2-13,3 mg/g); Fenilalanina (4,5-26,1 mg/g) Prolina (4,1-24,7 mg/g); Serina (4,4-26,5 mg/g); Treonina (4,7-28,1 mg/g); Triptofano (1,4-8,5 mg/g); Tirosina (4,0-23,8 mg/g); Valina (6,2-37,4 mg/g).
FIBRAS	4,0-7,0 %
LIPÍDIOS	6,0-12,0 %
ÁCIDOS GRAXOS	Ômega-6: Gama Linolênico (30,00 mg/g); Linolênico Essencial (33,00 mg/g); Dihomogamma Linolênico (1,59 mg/g). Ômega-3: Alfa Linolênico (0,04 mg/g); Docosahexaenóico (0,04 mg/g); Palmitoleico (5,90 mg/g); Oleico (0,50 mg/g); Erúcico (0,07 mg/g).
MINERAIS	Cálcio (1,68 mg/g); Magnésio (2,55 mg/g); Ferro (0,52 mg/g); Fósforo (9,18 mg/g); Potássio (18,30 mg/g); Sódio (10,98 mg/g); Boro (0,30 mg/g); Manganês (0,19 µg/g); Zinco (0,20 µg/g); Cobre (0,30 µg/g); Molibdênio (0,30 µg/g).
FITOPIGMENTOS	Carotenóides totais (0,551%); Beta-carotenoides 0,243%; Clorofila (1,472%); Xantofilas (0,271%); Zeaxantina (0,128%); Ficocianina (14,18%).
VITAMINAS HIDROSSOLÚVEIS	Vitamina B1 (Tiamina) (238,00 mg/g); Vitamina B2 (Riboflavina) (99,00 mg/g); Vitamina B3 (niacina) (3,67 mg/g); Vitamina B5 (Ácido Pantotênico) (3,40 mg/g); Vitamina B6 (Piridoxina) (13,20 mg/g); Vitamina B9 (Folato) (94,00 µg/g); Vitamina B12 (cianocobalamina) (6,60 µg/g); Vitamina H (Biotina) (1,00 mg/g); Colina (66,00 mg/g);
VITAMINA C (ÁCIDO ASCÓRBICO)	58,80 mg/g
VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS	Vitamina A (como Beta Caroteno) (29,00 µg/g); Vitamina E (D-atocoferol) (5,00 mg/g); Vitamina K (Fitomenadiona) (25,20 µg/g); Alfa Caroteno (7,50 µg/g); Beta-caroteno (1900,00 µg/g); Luteína e Zeaxantina (126,00 µg/g);
ENERGIA	2,9 Kcal/g

Fonte: Adaptado de ELFAR et al. (2022)

Devido ao seu alto teor de proteínas e vitaminas, a SPI foi nomeada o melhor alimento do futuro pela OMS, em 1996 (LÓPEZ-ROMERO et al., 2018). Além disso, possui uma ampla gama de pigmentos fotossintéticos como clorofila A; luteína. β -caroteno e as ficobiliproteínas (EL BAKY; EL BAROTY; MOSTAFA, 2020). Esses pigmentos pertencem à família de proteínas pigmentadas solúveis em água de cores vivas e são essenciais para a fotossíntese (EL BAKY; EL BAROTY; MOSTAFA, 2020; LUPATINI et al., 2017).

Numerosas doenças em humanos, incluindo câncer, hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes, obesidade e condições neurodegenerativas, inflamatórias e neurológicas são causadas pelo estresse oxidativo e processos inflamatórios (LÓPEZ-ROMERO et al., 2018; EL FAR et al., 2022; TROTTA et al., 2022; ALFADHLY et al., 2022). A *Spirulina* é amplamente utilizada como suplemento alimentar nutracêutico em todo o mundo (WU et al., 2016), por possuir propriedades antioxidantes, imunomoduladoras e anti-inflamatórias, portanto essa microalga pode ser extremamente benéfica para a saúde humana.

Entre as principais citocinas reguladas pela *Spirulina* estão IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ (WU et al., 2016). Sua atividade anti-inflamatória pode ser atribuída à redução da atividade da ciclooxigenase-2 (COX-2), embora o extrato de proteína também, reduza a peroxidação lipídica, aumente a atividade de enzimas antioxidantes, reduza os danos ao DNA em estudos *in vitro* e *in vivo* (WU et al., 2016). Após submeter células de neuroblastoma SH-SY5Y ao estresse oxidativo induzido por ferro, Bermejo-Bescós e colaboradores (2008) investigaram a capacidade da *Spirulina platensis* em inibir a peroxidação lipídica, bem como em aumentar a atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase (GR).

Evidências científicas demonstraram os efeitos benéficos da espirulina na Doença de Parkinson (DP) e DA. Por exemplo, ratos tratados com uma dieta enriquecida com *Spirulina* antes de uma lesão com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), exibiram regeneração de fibras nervosas dopaminérgicas estriatais e recuperação de dopamina, revelada pela imuno-histoquímica de tirosina hidroxilase (TH), um mês após a lesão (STRÖMBERG et al., 2005).

Além do mais, um ensaio clínico randomizado duplo-cego descobriu que a ingestão de 1g/dia de extrato etanólico de *Spirulina maxima* 70% por 12 semanas melhorou o desempenho cognitivo de idosos com demência leve a moderada, com

melhora significativa no aprendizado, quando avaliado antes e após o uso de *Spirulina maxima* comparado ao placebo (CHOI et al., 2022).

Além dos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, a SPI possui outras atividades biológicas. Por exemplo, ensaios clínicos que investigaram o efeito da suplementação de *spirulina* em marcadores de glicemia e perfil lipídico em pacientes com diabetes tipo 2 sugerem que ela tem efeitos benéficos na glicemia de jejum e níveis lipídicos (HATAMI et al., 2021).

1.16 Constituintes bioativos da *Spirulina*

1.16.1 Ficobiliproteínas

A ficocianina é um pigmento biliproteico não tóxico solúvel em água e a principal biliproteína da SPI, geralmente conhecida como C-ficocianina devido à sua origem cianobacteriana (FERNÁNDEZ-ROJAS et al., 2014). Por possuir tonalidade azul e a clorofila possuir tonalidade esverdeada, juntas são responsáveis pela coloração verde-azulada das cianobactérias (FERNÁNDEZ-ROJAS et al., 2014). Estruturalmente, a ficocianina é composta por dois grupos de proteínas, subunidades α e β . Essas subunidades α e β são feitas de um esqueleto de proteína, onde os grupos lineares do cromóforo tetrapirrol chamado de ficocianobilina são covalentemente conectados por ligações tioéter a resíduos de cisteína. Na SPI existe uma ficocianobilina na cadeia α e duas na cadeia β (FERNÁNDEZ-ROJAS et al., 2014).

Por possuir várias funções bioquímicas, incluindo efeitos antioxidantes, anticancerígenos e anti-inflamatórios, graças à sua estrutura linear de tetrapirrol de cadeia aberta (LI, 2022), estudos sustentam a ideia de que a ficocianobilina (4,7% da massa molar da ficocianina), que é liberado da ficocianina após sua quebra enzimática quando administrado *in vivo*, por via oral ou parenteral, é responsável pelas atividades biológicas benéficas da ficocianina (MINIC et al., 2018; MATAMOROS, PRIDA, ROL, 2021)

A ficocianobilina demonstrou ter fortes ações protetoras contra o estresse oxidativo em células neuronais PC12 expostas a lesões por peróxido de hidrogênio e glutamato, e em ratos com hipoperfusão cerebral aguda, um efeito associado à sua

modulação da expressão gênica (MARÍN-PRIDA *et al.*, 2013). O tratamento com ficocianobilina regulou a expressão cerebral de genes relacionados à neuroinflamação, metabolismo energético, remielinização, plasticidade sináptica, angiogênese e antiapoptose, oferecendo importantes mecanismos de proteção cerebral na hipoperfusão cerebral (MARÍN-PRIDA *et al.*, 2013). Além disso, a ficocianobilina inibiu mediadores de apoptose neuronal, micróglia, astrócitos e protegeu mitocôndrias isoladas de cérebro de rato (LI, 2022).

A potencial eficácia terapêutica da SPI no tratamento de doenças neurodegenerativas, incluindo a DA, pode ser atribuída aos seus diversos efeitos benéficos, composição nutricional, propriedades farmacológicas e constituintes bioativos.

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A DA é a forma mais prevalente de demência neurodegenerativa encontrada em pessoas idosas, representando 60 a 70% de todos os casos, afetando atualmente cerca de 55 milhões de pessoas. Na medida em que a população mundial está envelhecendo e com aumento da expectativa de vida, a demência está se constituindo um importante problema de saúde pública, particularmente nos países desenvolvidos e os tratamentos atuais concentram-se apenas em retardar a progressão dos sintomas. Nenhum medicamento atualmente disponível para pacientes com DA pode prevenir ou modificar o curso da doença.

Nas últimas décadas, pesquisadores têm se concentrado no desenvolvimento de novos medicamentos, especialmente compostos bioativos naturais, para tratar as doenças neurodegenerativas em estágios mais precoces da doença. Devido ao alto teor de proteínas e sua rica fonte de compostos antioxidantes e anti-inflamatórios, a SPI tem sido amplamente utilizada como suplemento nutricional neuroprotetor, favorecendo o desenvolvimento do sistema nervoso e do cérebro, compensando deficiências nutricionais e promovendo uma boa resposta imunológica, minimizando os efeitos nocivos de um sistema imunológico hiperativo.

Ademais, recentemente, a FDA dos Estados Unidos classificou à *Spirulina* como "*Generally Recognized as Safe*" (GRAS)". Além disso, o Comitê de *Dietary Supplements Information Expert Committee* (DSI-EC) da Convenção Farmacopeia dos Estados Unidos deu à para *S. maxima* e *S. platensis* o status "Classe A" após uma revisão completa de relatos de casos clínicos em humanos, dados toxicológicos de animais e relatórios de eventos adversos, considerando ambas as espécies seguras para os humanos consumirem (MARLES et al., 2011; WU et al., 2016).

Diante do exposto, é possível que a SPI tenha um efeito neuroprotetor, evitando danos neuronais associados à DA. Desse modo, este trabalho buscou investigar o efeito neuroprotetor da SPI sobre os déficits cognitivos e dano neuronal induzido por injeções ICV-STZ em camundongos, bem como a prospecção da SPI como uma possível estratégia terapêutica para DA.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito neuroprotetor do extrato aquoso de *Spirulina platensis* em camundongos submetidos ao modelo de Doença de Alzheimer induzido por injeções intracerebroventricular estreptozotocina (ICV-STZ).

3.2 Objetivos Específicos

Estudos *in vivo*

- Em animais com DAE induzida por injeções ICV-STZ avaliar:
 - ✓ Alterações comportamentais (memória, ansiedade e motores) em camundongos submetidos ao modelo injeções de DA induzido por ICV-STZ.
 - ✓ Alterações oxidativas (peroxidação lipídica, nitrito; glutathione reduzida e formação do ânion superóxido, no córtex e hipocampo);
 - ✓ Atividade *in vivo* da AChE no córtex e hipocampo;
 - ✓ Resposta inflamatória (GFAP e IBA-1);
 - ✓ Plasticidade sináptica (BDNF);
 - ✓ Morte neuronal (cresil violeta).

Estudos *in silico*

- ✓ Identificar os possíveis alvos celulares (AChE e IRS-1) da ficocianobilina e avaliar as interações moleculares existentes entre eles, através de simulações por *docking molecular*.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* adultos, machos, pesando entre 25 e 30g, provenientes e mantidos do biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos sob condições de temperatura e umidade controladas, num ciclo de doze horas de claro e escuro, com livre acesso à alimentação e à água.

Em relação aos cuidados com os animais, este estudo seguiu os princípios éticos da experimentação animal estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso de animais (CEUA) da UFC sob o número de registro 3598100320 (ANEXO A).

4.2 Drogas

Estreptozotocina (SIGMA, EUA); Cloridrato de xilazina 2% (Kensol® Laboratórios König S.A, Argentina); Cloridrato de ketamina 5% (Vetanarcol®, Laboratórios König S.A, Argentina); Iodeto de acetiltiocolina (98%) (AcSCh), ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (SIGMA, EUA). Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico.

4.3 Cultivo de SPI

O Dr. Denis Von der Weid da Antenna Technologies Foundation (Genebra, Suíça) doou o inóculo, que foi cultivado no laboratório da empresa *Spirulina* Brasil G&F Ltda, sob supervisão da Professora Francisca P. Joventino, utilizando o meio de cultura Zarrouk e ambiente ventilado com iluminação de 3000 lux por 12 horas. Os parâmetros físicos, químicos e microbiológicos foram avaliados por meio de um processo que visa reduzir a intensidade da luz e minimizar a taxa de evaporação. Após retirar a *Spirulina* dos tanques e retirar o excesso de água, o material foi pesado para cálculo da biomassa úmida e dessecado por 5 horas. O material seco foi novamente pesado para determinação da biomassa seca e armazenado a -20 °C até o uso.

4.4 Protocolo Experimental

A Figura 7 apresenta o desenho experimental do estudo. A Tabela 2 mostra que um total de 120 animais foram divididos em cinco grupos experimentais, cada um com 24 animais. Antes e após o procedimento de cirurgia estereotáxica a glicemia de todos os animais foram verificadas. Doses orais de SPI (v.o.) de 50 e 100 mg/kg foram administradas duas horas após a segunda cirurgia e uma vez ao dia durante os 16 dias seguintes. Foram usados os resultados de LIMA et al. (2017) para estabelecer as doses de SPI do nosso estudo. Os animais do protocolo 1 foram submetidos a testes de atividade locomotora (teste de campo aberto), avaliação de memória (teste do labirinto em Y, teste de reconhecimento de objetos e teste de esquiva passiva) e avaliação da ansiedade por meio do labirinto em cruz elevado (LCE).

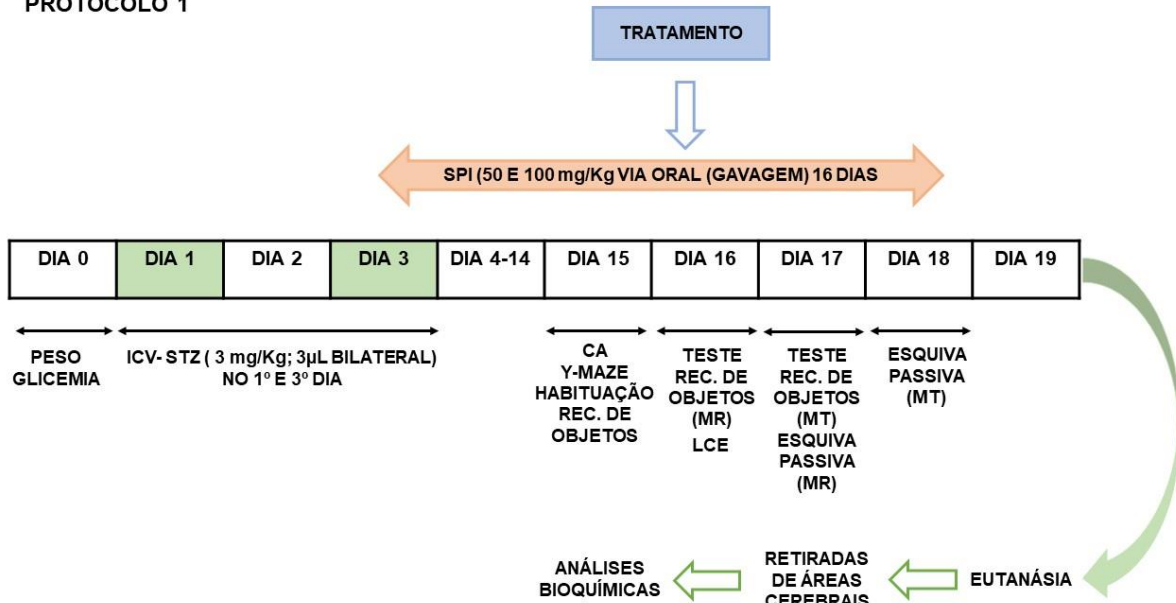
No protocolo 2 (12 animais), foi avaliado a memória espacial (teste do labirinto aquático). Com base nos resultados dos protocolos 1 e 2, a dose de 100 mg/kg foi escolhida para explorar como funcionam os mecanismos de ação neuroprotetores. Após completar os testes comportamentais, os animais foram eutanasiados e suas regiões cerebrais (córtex pré-frontal e hipocampo) foram retiradas para análises bioquímicas: glutatona reduzida (GSH), malondialdeído (MDA); nitrito; ânion superóxido e AChE, ou feita a perfusão cerebral para as análises imuno-histoquímicas (IBA-1, GFAP, BDNF, Cresil Violeta).

Tabela 2. Grupos experimentais.

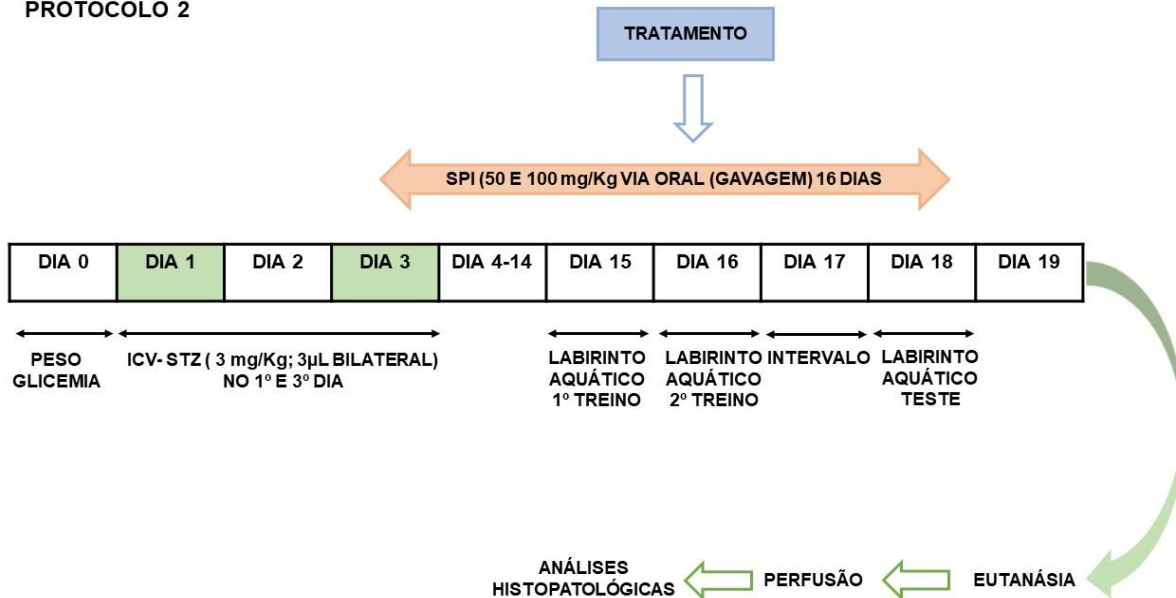
Grupo	Dose	Tratamento	Número de animais
1 – Controle + veículo	-	aCSF tratado com veículo (água destilada) v.o	24
2 – Controle + SPI100	100 mg/kg	aCSF tratado com SPI 100 mg/kg v.o	24
3 – STZ + veículo	-	STZ tratado com veículo v.o	24
4 – STZ + SPI50	50 mg/kg	STZ tratado com <i>spirulina</i> 50 mg/kg v.o	24
5 – STZ + SPI100	100 mg/kg	STZ tratado com <i>spirulina</i> 100 mg/kg v.o	24

Figura 7. Diagrama do protocolo experimental mostrando a sequência dos testes comportamentais realizados nos subgrupos de animais.

PROTOCOLO 1



PROTOCOLO 2



4.5 Dosagem da glicemia

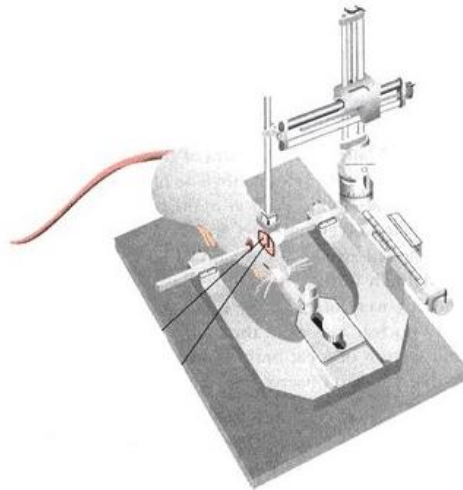
Os níveis de glicose no sangue foram medidos em todos os animais sem restrição alimentar para garantir que eles não eram diabéticos (TABAK et al., 2012). As dosagens foram feitas no dia 0, imediatamente antes do início dos procedimentos de administração de STZ e no dia 19, antes da eutanásia. Uma gota de sangue foi coletada perfurando a ponta da cauda dos animais com tesoura cirúrgica estéril. Essa amostra de sangue foi colocada na tira teste do medidor de glicose (On Call® Plus), e os resultados foram obtidos em mg/dL.

4.6 Cirurgia Estereotáxica: Modelo de Doença de Alzheimer Esporádica (DAE) induzido por Estreptozotocina (STZ)

Os procedimentos de lesão foram realizados através de cirurgia estereotáxica, proposto por Lannert e Hoyer (1998). Os animais foram sedados com xilazina (10 mg/kg intraperitoneal) e cetamina (100 mg/kg intraperitoneal) antes de serem colocados no aparelho estereotáxico (Stoelting®). Para a detecção do bregma, foi feita uma incisão sagital mediana de 2 cm no topo do crânio com auxílio de bisturi, expondo as suturas dos ossos cranianos (Figura 8). Foram realizadas duas marcações no crânio dos animais em ambos os lados sobre os ventrículos laterais usando as seguintes coordenadas: 0,5 mm posterior ao bregma, 1,1 mm lateral à sutura sagital e 2,8 mm abaixo a superfície do cérebro (PAXINOS; FRANKLIN, 2004). Então foram realizadas perfurações nos crânios dos animais com uma broca de baixa rotação (Dremel) em cada marcação, permitindo entrada da seringa Hamilton com o STZ (3 mg/Kg) sendo injetado ICV-STZ bilateralmente no dia 1 e 3 do experimento, em ambos os ventrículos, sendo infundido 1,5µL (45µg/1,5µL) em cada hemisfério (SHARMA; GUPTA, 2001). As microinjeções foram realizadas por administração de STZ ou solução de veículo, lentamente, ao longo de um período de 1 minuto e a agulha permaneceu na posição durante mais 5 minutos para prevenir o refluxo ao longo da seringa. Após as injeções, os cortes feitos nos animais foram suturados com fio cirúrgico de algodão (AP 0,4 15x 45 cm) e desinfetados com iodo povidine. Os animais do grupo controle tiveram procedimentos cirúrgicos idênticos aos animais do grupo experimental, mas não receberam STZ; em vez disso, a agulha foi colocada

nas mesmas coordenadas estereotáticas, seguida de infusão de fluido espinal cerebral artificial estéril (aCSF).

Figura 8. Desenho mostrando como o procedimento de cirurgia estereotática é realizado em camundongos.



Fonte: Abdelwahab et al. (2011).

4.7 Testes comportamentais

4.7.1 Avaliação da atividade locomotora - Teste do Campo Aberto (CA)

Para examinar o estado emocional de ratos, Hall (1934) descreveu pela primeira vez o teste de campo aberto. O teste empregado neste estudo foi baseado no modelo Broadhurst (1957) e utilizado para avaliar a atividade locomotora e o comportamento exploratório do animal.

O campo aberto é uma arena quadrada de acrílico preto (30 x 30 x 15 cm) com nove quadrantes uniformemente espaçados no chão (Figura 9). Durante o teste, o animal foi deixado na arena por cinco minutos para explorar seu entorno. Os parâmetros avaliados foram o número de quadrantes atravessados pelo animal (número de cruzamentos), número de vezes que o animal se levantou para explorar o ambiente, mantendo-se suspenso apenas pelas patas traseiras, caracterizando o comportamento exploratório do tipo “*rearing*”, distância total percorrida e velocidade média de cada animal, analisadas por meio do software ANY-maze (versão 4, USA). Para evitar a interferência do cheiro de fezes e urina durante o teste, a arena foi limpa com álcool 20% após a retirada de cada animal.

Figura 9. Arena do Campo Aberto



Fonte: Laboratório de Neurociências e Comportamento – LNC

4.7.2 Avaliação da memória de trabalho - Teste do labirinto em Y

Neste teste, avalia-se a memória operacional ou de trabalho (curto-prazo) visuoespacial, que tem como principal área envolvida, o córtex pré-frontal (SARTER; BODEWITZ; STEPHENS, 1988). O labirinto em Y é composto por 3 braços (1,2 e 3) de acrílico com 16 cm de altura, 5 cm de largura e 40 cm de comprimento (Figura 10). O animal foi colocado no braço 1 e foi feita a contagem das alternações espontâneas as entradas nos outros braços, durante 8 (oito) minutos. Todas as entradas em cada braço foram sequencialmente anotadas, havendo, assim, o registro do número total de entradas em cada braço, bem como a sequência de entradas. As informações foram analisadas para determinar o número de entradas do braço sem repetição. Os dados foram expressos como a porcentagem de alternância nos braços sem repetição. A alta taxa de alternância nos grupos de controle indica que os animais podem lembrar em qual braço entraram por último, mostrando que o teste foi bem-sucedido (LALONDE, 2002). Entre cada sessão, o labirinto foi higienizado com uma solução de álcool a 20% e secado com toalhas de papel. O resultado é expresso em porcentagem e obtido através da seguinte fórmula matemática:

$$\text{Alternações espontâneas (\%)} = \frac{\text{número de acertos}}{\text{número total de entradas} - 2} \times 100$$

Figura 10. Labirinto em Y



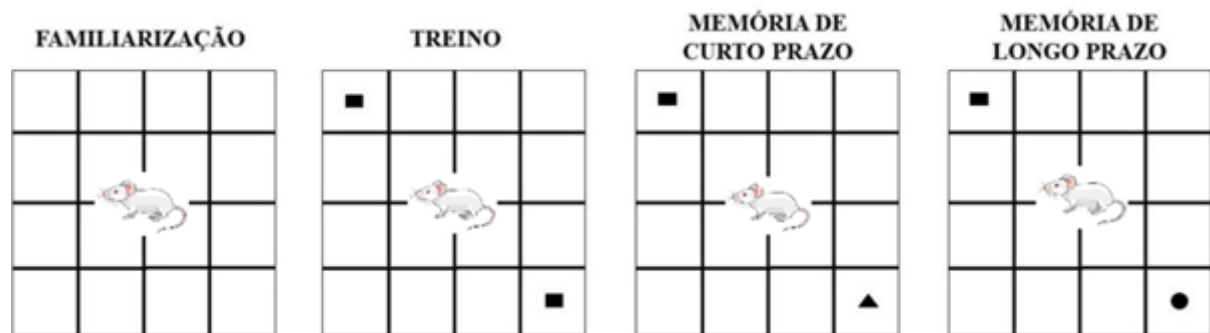
Fonte: <https://www.medicalexpo.com>

4.7.3 Avaliação da memória de reconhecimento – Teste do Reconhecimento de Objetos

O teste de reconhecimento de objetos é baseado na tendência natural dos animais buscarem o novo (ENNACEUR; DELACOUR, 1988). Os animais foram ambientados (familiarização) na arena de campo aberto 24h antes da realização do teste. O teste de reconhecimento de objetos foi realizado 13 dias após a segunda injeção STZ. O teste foi realizado na arena do campo aberto, onde dois objetos idênticos, colocados em lados opostos, foram colocados nos cantos da arena. O animal foi colocado no quadrante do central, no lado oposto aos objetos. O teste foi feito em três sessões. Na primeira, o animal foi deixado para explorar o ambiente por 10 min (treino), com dois objetos idênticos. Na segunda, realizada uma hora depois (memória curto prazo), o objeto situado à direita foi substituído por um novo objeto, e foi medido o tempo de exploração em cada objeto (antigo e novo) durante 5 minutos. Na terceira, realizada vinte e quatro horas depois (memória longo prazo), o objeto situado à direita foi substituído por um novo objeto, e foi medido o tempo de exploração em cada objeto (antigo e novo) durante 5 minutos, como representado na Figura 11. O índice de reconhecimento ou de discriminação foi calculado como o tempo de exploração do objeto novo menos o tempo de exploração no antigo sobre o tempo total de exploração dos dois objetos. A arena e os objetos foram limpos com álcool a

20 % entre os testes. Os seguintes comportamentos foram considerados como exploração dos objetos: farejar, lamber ou tocar o objeto com o nariz ou com as patas da frente ou direcionar o nariz para o objeto a uma distância ≤ 1 cm.

Figura 11. Representação da metodologia do teste de reconhecimento de objetos



4.7.4 Avaliação da memória aversiva – Teste da Esquiva Passiva

O teste de esquiva passiva (*Step Down*) envolve a inibição da tendência natural do animal de explorar além da plataforma e envolve o aprendizado de evitar o choque, um componente aversivo que constitui uma resposta condicionada (IZQUIERDO; DIAS, 1983; De NOBLE et al. 1986). O aparato consiste em uma caixa de acrílico (48 x 22 x 22) com plataforma e grade eletrificada no piso (Figura 12). O animal foi colocado na plataforma, tendo um minuto para se adaptar ao aparato e, em seguida, retirado. Após 30 segundos, o foi colocado novamente na plataforma e ao descer da plataforma recebeu um choque de 0,5 mA, durante 1 segundo, com o tempo de latência para descer sendo registrado, até um máximo de 5 minutos (treino). Retirou-se o animal e após 15 minutos este foi colocado novamente na plataforma e registrou-se a latência de descida (avaliação da memória curto prazo), e ao descer da plataforma recebeu um outro choque. A retenção do aprendizado (avaliação da memória longo prazo) foi testada após 24h, quando o animal foi colocado na plataforma e o tempo de latência para a descida da plataforma foi registrada, nessa etapa o animal não recebe o choque.

Figura 12. Aparelho de Esquiva Passiva camundongos e ratos - Step Down

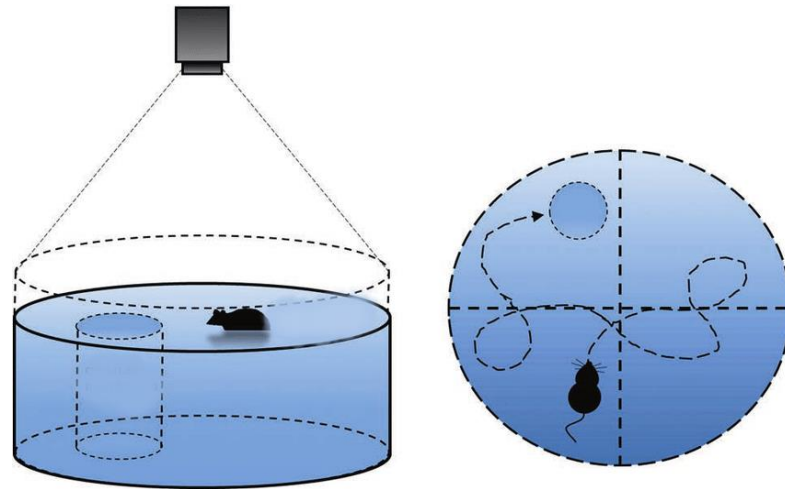


Fonte: Insight LTDA.

4.7.5 Avaliação da memória espacial - Teste do Labirinto Aquático

Com o objetivo de avaliar o aprendizado e a memória (longo-prazo) visuo-espacial, foi utilizado o labirinto aquático de Morris ou *Water maze* com pistas (Figura 13) (MORRIS, 1984). O animal foi colocado de forma aleatória em uma piscina circular (90 cm de diâmetro e 60 cm de profundidade) contendo água turva (até 30 cm de altura) com tinta branca não tóxica à 26°C, dividida espacialmente em quatro quadrantes, devendo encontrar uma plataforma (7cm de diâmetro) submersa 2cm. O animal teve 60s para achar a plataforma (que permanece no mesmo local em todos os treinos) e lá permanecer por 10s. Este treino foi realizado seis vezes por dia com intervalos de 30s entre os treinos, durante dois dias (aprendizagem) e 48h após o último treino, os animais foram submetidos ao teste, agora sem a plataforma, onde foi avaliada a aquisição da memória. O animal permaneceu na piscina por 60s e foi registrado o tempo que o animal permaneceu no quadrante em que a plataforma deveria estar, o tempo de latência para encontrar o local da plataforma e o número de vezes em que ele cruzou o local exato da plataforma.

Figura 13. Labirinto Aquático de Morris



Fonte: Kutikhin, et al. (2017)

4.7.6 Avaliação da ansiedade – teste do Labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE é um método que avalia as respostas de ansiedade em roedores, descrito pela primeira vez por Pellow et al. (1985). É baseado na tendência natural que roedores tem de explorar novos ambientes e na aversão que eles apresentam por ambientes abertos e desprotegidos. O LCE é um aparato de acrílico elevado 50 cm do chão formado por 4 braços (50cm x 10cm), sendo dois braços fechados (com paredes de 40 cm de altura) e dois braços abertos (sem paredes) que se cruzam (Figura 14). A iluminação empregada no teste foi de baixa intensidade (luz vermelha) e o experimento foi realizado durante a fase clara do ciclo (PELLOW et al., 1985). Cada animal foi colocado individualmente no centro do aparato, com o focinho voltado para um dos braços fechados, permitindo-lhe livre exploração durante 5 minutos. Após o teste de cada animal, o aparato foi limpo cuidadosamente com uma solução de álcool 20%. Todas as sessões foram gravadas por uma câmera, para posterior análise dos parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade.

Foram analisados os seguintes parâmetros convencionais: (1) % de entradas nos braços abertos: a frequência de entrada com as quatro patas nos braços abertos; (2) Tempo nos braços abertos: a quantidade total de tempo que o animal

passou nos braços abertos. As porcentagens de entrada nos braços abertos foram calculadas pela seguinte fórmula: $(\text{Entradas: } [\text{aberto}/\text{total (aberto+fechado)}] \times 100)$, a porcentagem de tempo nos braços abertos $(\text{tempo nos braços abertos} / 300 \times 100)$ (PELLOW et al., 1985, CAROLA, et al., 2002). O aumento da entrada no braço aberto/ou tempo de braço aberto indica redução da ansiedade, em contraste, o aumento da entrada no braço fechado/ou tempo de braço fechado refere-se a influências ansiogênicas.

Figura 14. Labirinto em Cruz Elevado



Fonte: <https://www.medicalexpo.com/pt/fabricante-medico/labirinto-cruz-elevado-53097.html>

4.8 Avaliações bioquímicas

4.8.1 Determinação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi medida pela dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (DRAPER; HADELY, 1990). No dia do ensaio, 60 µL do homogenato (10% em tampão fosfato) de córtex pré-frontal e hipocampo foi introduzido em tubo de ensaio e centrifugado a 1.200 rotações por minuto (rpm) 4 °C por 30 minutos. Após a centrifugação, 100 µL de ácido perclórico a 35% foi adicionado para interromper a peroxidação e, centrifugado novamente a 5.000 rpm 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e a este foi adicionado 50 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2%. Posteriormente, levado ao banho de água por 30 minutos a uma temperatura variável de 95 – 100 °C. A solução, foi retirada e colocada para esfriar a

temperatura ambiente. Após esfriar, 150 μL da solução foi adicionada nos poços da placa de ELISA e foi feita a leitura em 535 nm. A curva padrão foi obtida mediante leitura de várias concentrações (640; 320; 160; 80; 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,2; 0,6 μM) de MDA padrão e os resultados foram expressos em concentração (μM).

4.8.2 Determinação da concentração de nitrito/nitrato

Nesse ensaio o reativo de Griess (N-1-naftiletilenodiamina a 0,1% em água bidestilada, sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% na proporção 1:1) revela a presença de nitrito/nitrato (NO_2/NO_3) em uma amostra (urina, plasma, homogenato tecidual) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor róseo, com um pico de absorbância em 540 nm (GREEN et al., 1982). Para realização do ensaio, os homogenatos (10% em tampão fosfato) de córtex pré-frontal e hipocampo foram centrifugados a 1.2000 rpm por 15 min a 4 °C e 100 μL de cada sobrenadante foi adicionado a 100 μL do reagente de Griess. Para o branco, foi utilizado 100 μL do tampão fosfato e 100 μL reagente de Griess. Após 10 minutos, foi feita a leitura das absorbâncias em 540 nm. A curva padrão foi obtida mediante leitura de várias concentrações de nitrito padrão (100; 50; 25; 12,5; 6,52; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,195 μM) e os resultados foram expressos em concentração (μM). As leituras da absorbância dos padrões (y) foram plotadas contra a concentração de cada padrão (x), então foi feita a determinação da equação da reta, que foi usada para a determinação da concentração de nitrito em cada amostra.

4.8.3 Acúmulo de superóxido

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi expressa indiretamente como acumulação do substrato superóxido (O_2^-) e determinada pela adaptação do método Marklund (MARKLUND; MARKLUND, 1974). O método tem como princípio a auto-oxidação do pirogalol com formação de hidroxibenzoquinona, a qual inibe a redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT). Para o ensaio, 30 μL de homogenato em tampão de fosfato (PBS), 99 μL de tampão de fosfato (PBS), 6 μL de 1,25 mmol/L de MTT e 15 μL de 100 $\mu\text{mol/L}$ de pirogalol foram pipetados para uma microplaca de 96 poços. O poço com o branco da reação continha apenas 144 μL de tampão fosfato e 6 μL de MTT. A placa foi incubada

a 37 °C durante 10 min e, em seguida, 150 µL de dimetilsulfóxido foram adicionados a todos os poços da placa para parar a reação. As leituras de absorbância foram realizadas em um leitor de microplaca no comprimento de onda de 570 nm. A partir da correção para a concentração de proteínas totais no homogenato, a avaliação do acúmulo de superóxido foi expressa em mmol/mg de proteína.

4.8.4 Determinação dos níveis de Glutathiona reduzida (GSH)

O estresse oxidativo pode causar mudanças no estado redox da glutathiona aumentando a liberação de glutathiona oxidada (dissulfeto) (GSSG). Um decréscimo das concentrações de GSH e/ou alta concentração de GSSG e uma baixa relação das concentrações dessas duas moléculas (razão GSH/GSSG), são interpretadas como prova de desequilíbrio redox. Para a determinação da glutathiona reduzida (γ -glutamil-L-cisteinilglicina, GSH), o homogenato (10%) do tecido cerebral foi preparado com 0,02 M de EDTA. Então, 400 µL da suspensão das amostras lisadas foram adicionados a 800 µL de tampão Tris-HCl (0,4 M, pH 8,9) e 20 µL do cromógeno DTNB (5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico), também chamado reagente de Ellman. Por fim, a absorbância foi medida por espectrofotometria a 412 nm (UV ASYS 340, Biochrom, Cambridge, Reino Unido), usando como curva de calibração um padrão de GSH. Os resultados foram expressos em nmol GSH/mg de proteínas (SHARMA et al., 1997).

4.8.5 Avaliação da atividade AChE *in vivo*

Após a realização dos testes comportamentais os animais de cada grupo experimental foram eutanasiados, os cérebros foram dissecados (córtex e hipocampo), e posteriormente processados. A atividade da AChE foi medida segundo o método de ELLMAN et al. (1961) que consiste na hidrólise da acetiltiocolina (ACTI) pela AChE, originando colina que, combinando-se com DTNB, produz um composto de coloração amarela, quantificado a 412 nm no leitor de Elisa (ASYS UVM 340). O córtex e hipocampo dos animais foram homogeneizados (10%) em tampão fosfato, pH 7,4 e diluído em tampão fosfato, para ajuste da quantidade de proteína no ensaio (0,5 mg.mL) e pipetado 34 µL nas cavidades da microplaca em triplicata, em seguida, foram adicionados 134 µL do DTNB, preparado a 0,75 mM em tampão

fosfato, pH 7,4. Foram acrescentados a cada amostra, para iniciar a reação 34 μL de ACTI, preparado a 9 mM. Após a adição do ACTI, foram realizadas as leituras da absorbância no leitor de Elisa com um comprimento de onda de 412 nm, durante 5 min com intervalos de 30s.

O cálculo da atividade da AChE, foi baseado na equação de Lambert-Beer:

$$A = c. \epsilon. d$$

Onde,

- A = absorbância (D.O.)
- c = concentração
- ϵ = coeficiente de extinção molar ($1,36. 10^4 \text{ mmol}^{-1}. \text{cm}^{-1}$)
- d = caminho óptico (0,642 cm)

Assim:

$$c \text{ ou } \text{nmol. min}^{-1}. \text{mL}^{-1} = \frac{(\Delta \text{D.O. min}^{-1}) \times 1000}{13,6 \times 0,642}$$

4.9 Análises histopatológicas

4.9.1 Perfusão Transcardíaca

Dezoito dias após as injeções ICV-STZ e realização dos testes comportamentais os animais foram anestesiados, com xilazina (10 mg/kg) e cetamina (90 mg/kg), por via intraperitoneal (i.p.) e submetidos à perfusão transcardíaca. Os animais foram colocados na posição de decúbito dorsal em um local apropriado para realização da perfusão dentro da capela de exaustão. Foi feita uma incisão na parede abdominal, para expor o coração (GAGE; KIPKE; SHAIN, 2012). Então, cuidadosamente, foi inserida uma agulha na extremidade posterior do ventrículo esquerdo, sendo está conectada a uma seringa de 60 mL. Em seguida, iniciou-se a passagem do líquido salina seguida do fixador paraformaldeído a 4% através do ventrículo e, imediatamente, fez-se uma incisão no átrio direito para criar uma saída de sangue (GAGE; KIPKE; SHAIN, 2012). Com todo cuidado, os cérebros foram removidos e fixados com paraformaldeído a 4% durante 24h e armazenados em sacarose a 30% (4°C), até o momento da microtomia.

4.9.2 Microtomia

Os encéfalos armazenados na solução de sacarose 30% foram submetidos a microtomia por congelamento. Dentro do criostato rotativo (Leica CM3050 S, Heidelberg, Alemanha) os encéfalos foram congelados (-20° C). Então, foram feitos cortes coronais do córtex pré-frontal e hipocampo, com espessura de 10µm, os quais foram distribuídos de forma sequencial em lâminas histológicas silanizadas. Os cortes foram armazenados no freezer (-20°C) até a realização das etapas de imunohistoquímica e coloração histológicas.

4.9.3 Avaliação da astrogliose e microgliose através da imunomarcação para GFAP e IBA-1 e avaliação da plasticidade sináptica através da imunomarcação para BDNF

Os astrócitos possuem um papel fundamental na manutenção da homeostase cerebral. Eles possuem a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) do inglês *Glial Fibrillary Acidic Protein*, uma proteína exclusiva dos astrócitos que os diferencia dos demais tipos celulares (O'CALLAGHAN; SRIRAM, 2005). Já a microglia são células cerebrais imunocompetentes. O marcador de microglia IBA-1 foi utilizado para confirmar a presença e ativação dessas células (microgliose). As fatias foram lavadas três vezes por 5 minutos em PBS, sendo o bloqueio da peroxidase endógena feito com H₂O₂ 1,05% em metanol 10% em PBS, durante 40 minutos a temperatura ambiente (TA). Após lavar 3 vezes por 5 minutos em PBS e bloquear as proteínas endógenas com uma solução bloqueadora (10% de soro de cavalo e 1% de Triton X-100 em PBS) por 2 horas a TA. Após as fatias foram incubadas com os anticorpos primários anti-GFAP diluído na solução bloqueadora (mouse, 1:200; Sigma-Aldrich), anti-iba-1 (rabbit polyclonal, 1:200; WAKO, Japão) e anti-BDNF (mouse, 1:200; Sigma-Aldrich) overnight a 4°C. As fatias foram então lavadas 3 vezes por 10 minutos em PBS, sendo em seguida incubadas com polímero marcado com HRP conjugado com anticorpos anti-mouse e anti-rabbit (Dako EnVision + Dual Link System-HRP, Dako) por 1 hora a TA, e lavados novamente 3 vezes por 5 minutos com PBS. A marcação foi revelada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB Peroxidase Substrate Kit; Dako). A reação foi interrompida, lavando-se as lâminas em água destilada.

Por fim, após secagem, as lâminas foram mergulhadas em xilol e montadas com entellan (Merck, Alemanha). Para a quantificação da imunorreatividade as lâminas foram visualizadas em um microscópio (Nikon Elipse E200) com aumento de 100x. Foram selecionadas 3 fatias do córtex pré-frontal e 3 fatias do hipocampo de cada animal, aleatoriamente, e a quantificação semiquantitativa da densidade óptica foi realizada em todas as imagens utilizando o software Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA). A densidade óptica final de cada imagem foi dada pela densidade do branco subtraído da densidade da imagem total. Foi calculada a média dos 3 valores por animal, e foi calculada a média dos valores obtidos para o grupo controle, e os demais valores foram calculados como porcentagem desse valor.

4.9.4 Avaliação de morte celular através da coloração de Cresil Violeta

Neste estudo, a viabilidade celular foi analisada pela coloração de cresil-violeta. A coloração de cresil-violeta é utilizada para evidenciar os corpúsculos de Nissl presentes no citoplasma de neurônios viáveis (SCORZA et al., 2005). As lâminas com os cortes cerebrais de córtex pré-frontal e hipocampo foram mergulhadas em água destilada durante um minuto, posteriormente, foram incubados na solução de cresil de violeta 0,5% preparada em tampão de acetato (20 % acetato de sódio 2,7% + 80% de ácido acético glacial a 1,2 %), por um período de três minutos. A fixação da marcação foi feita com duas lavagens em tampão de acetato. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em álcool (50, 70 e 100%). Posteriormente, foram mergulhadas em xilol e montadas com entellan (Merck, Alemanha). Para a quantificação dos neurônios corados com Nissl, as lâminas foram visualizadas em um microscópio (Nikon Elipse E200) com aumento de 200x. Foram selecionadas 3 fatias de cada animal, aleatoriamente, e a quantificação dos neurônios corados foi realizada em todas as imagens utilizando o software Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA) com um gride de 1000000. No hipocampo, foram analisadas as subáreas CA1 (Corno de Amon 1), CA3 (Corno de Amon 3) e GD (Giro Denteado). Foi calculada a média dos 3 valores por animal, e os resultados expressos como número de células viáveis. As células foram consideradas neurônios viáveis quando apresentaram coloração violeta no citoplasma, bem como, aspectos morfológicos normais (células de forma redonda ou oval com núcleos centralizados).

4.10 Estudo de modelagem molecular

4.10.1 Docking molecular

A fim de examinar se a ficocianobilina, a principal proteína constituinte da SPI, poderia ser a responsável pela inibição da AChE, bem como poderia interagir com o substrato do receptor de insulina (IRS-1) foi realizado um estudo de modelagem molecular *in silico*. A estrutura da ficocianobilina (Fernández-Rojas et al., 2014) foi modelada tridimensionalmente no software Avogadro 1.1.2 (HANWELL et al., 2012) e otimizada geometricamente utilizando o método Teoria Funcional da Densidade (DFT) com funcional de correlação B3LYP e base 6-31G(d) presentes no software GAMESS (BARCA et al., 2020). A estrutura proteica (alvo) de acetilcolinesterase (PDB: 4M0E) e Receptores de Insulina - IRS1 (PDB: 1IRS) de organismo *homo sapiens* foram obtidas no *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>). A posição do encaixe do acoplamento foi baseada no ligante nativo da macromolécula e com o uso do Servidor *Computed Atlas of Surface Topography of proteins* - CASTp (<http://sts.bioe.uic.edu/castp/calculation.html>). Para simulação de *docking molecular* foram utilizados o AutoDock tools (ADT) v4.2 para preparação do ligante e alvos (MORRIS et al., 2009) e AutoDock Vina 1.1.2 para execução dos cálculos (TROTT; OLSON, 2010). A afinidade de ligação e as interações entre resíduos foram usados para determinar melhores interações moleculares. O resultado foi visualizado usando ADT, Discovery Studio v4.5 (BIOVIA, 2020) e PLIP (SALENTIN et al., 2015).

3.14 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.01. Os resultados dos testes de normalidade de Shapiro-Wilk, que avaliam se os dados apresentam distribuição normal, estabeleceram a utilização de testes paramétricos e não paramétricos para avaliação estatística dos resultados. Para dados normalmente distribuídos, utilizou-se a análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni para comparações dentro dos grupos como um teste post-hoc, e os resultados foram apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão médio).

O teste de Kruskal Wallis e o teste de Dunn's foram utilizados para a análise dos dados não paramétricos e os valores foram relatados pela mediana (min-max).

Para a comparação entre dois grupos distintos, utilizou-se o Test t de Student, para testes que apresentaram resultados paramétricos. Já os dados não paramétricos foram analisados utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Em todos os estudos, o limiar de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

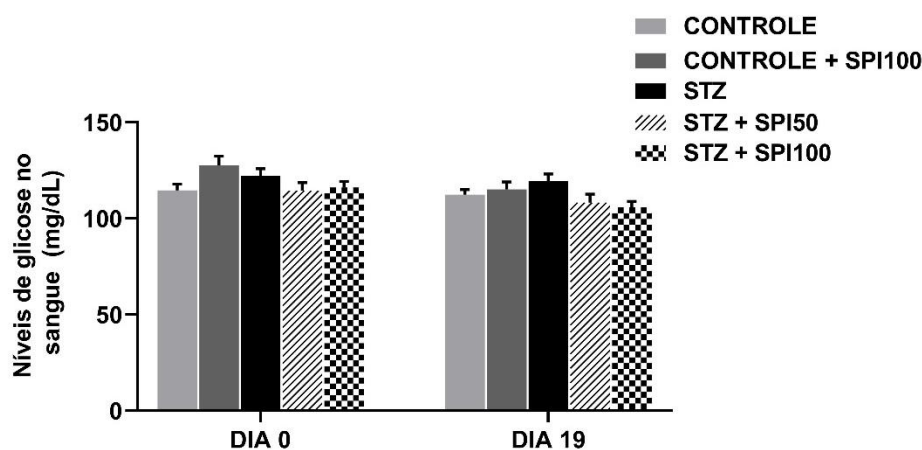
5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da glicemia

5.1.1 Níveis de glicose no sangue periférico em camundongos submetidos ao modelo de DAE por administração ICV-STZ.

Os níveis de glicose no sangue periférico dos animais não se alteraram antes ou após a administração da STZ ou tratamento com SPI. Isso mostrou que ICV-STZ não causa alteração no metabolismo da glicose periféricamente, o que já era esperado (Figura 15).

Figura 15. Níveis de glicose no sangue periférico de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.



Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM ($n = 11$). Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

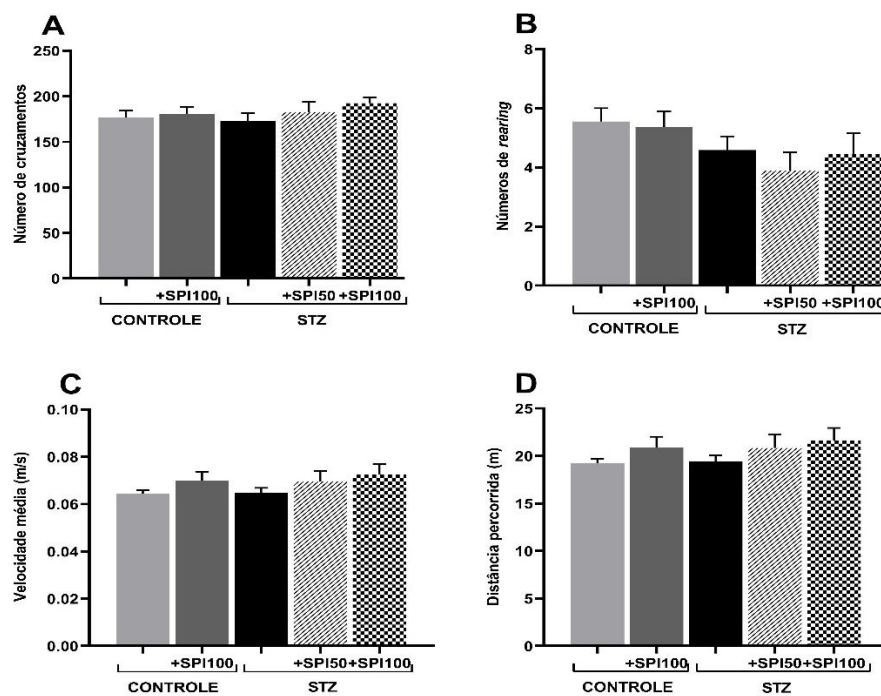
5.2 Avaliação comportamental

5.2.1 Efeito do extrato aquoso de SPI (50 e 100 mg/Kg) sobre a atividade locomotora (teste do campo aberto) de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.

Na avaliação da atividade locomotora após a administração de STZ, não houve diferenças significativas no número de cruzamentos (controle: $177 \pm 7,57$; controle + SPI100: $180,5 \pm 7,88$; STZ: $172,7 \pm 8,83$; STZ + SPI50: $182,7 \pm 11,2$; STZ

+ SPI100: $192,4 \pm 6,11$;) (Figura 16A); no número de “rearing” (controle: $5,5 \pm 0,44$; controle + SPI100: $5,5 \pm 0,52$; STZ: $4,5 \pm 0,46$; STZ + SPI50: $3,9 \pm 0,60$; STZ + SPI100: $4,5 \pm 0,69$) (Figura 16B); na velocidade média (controle: $0,064 \pm 0,001$; controle + SPI100: $0,069 \pm 0,003$; STZ: $0,064 \pm 0,002$; STZ + SPI50: $0,069 \pm 0,004$; STZ + SPI100: $0,072 \pm 0,004$) (Figura 16C) e na distância percorrida (controle: $19,2 \pm 0,47$; controle + SPI100: $20,9 \pm 1,11$; STZ: $19,4 \pm 0,64$; STZ + SPI50: $20,8 \pm 1,38$; STZ + SPI100: $21,4 \pm 1,29$) (Figura 16D) comparado ao grupo STZ. Demonstrando que a atividade locomotora dos animais não estava afetada.

Figura 16. Efeito do tratamento com SPI (50 e 100 mg/Kg, v.o.) sobre a atividade locomotora de camundongos submetidos ao modelo de DAE por induzido por ICV-STZ no teste do CA.



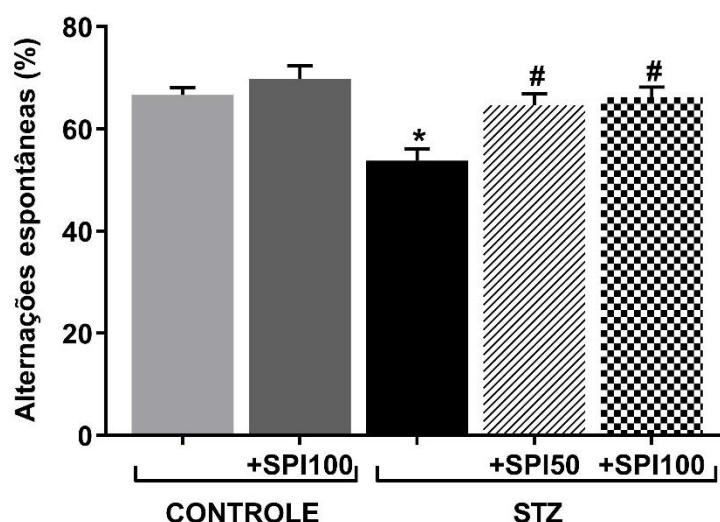
Número de cruzamentos (A), número de “rearing” (B), velocidade média (C) distância percorrida (D). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM (n = 11). Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

5.2.2 Efeito do extrato aquoso de SPI (50 e 100 mg/Kg) sobre a memória de trabalho (Y-maze) de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.

Na avaliação da memória de trabalho os animais submetidos ao modelo de DAE induzido por STZ apresentaram déficit significativos na memória de trabalho (percentual de alterações espontâneas: controle: $66,65 \pm 1,45$; STZ: $53,81 \pm 2,25$, p

< 0,05), quando comparado aos animais do grupo controle. No entanto, o tratamento com SPI em ambas as doses protegeu contra os déficits de memória de trabalho induzido por ICV-STZ (STZ + SPI50: $64,65 \pm 2,25$ $p < 0,05$; STZ + SPI100: $66,22 \pm 1,94$ $p < 0,05$) (Figura 17).

Figura 17. Efeito da SPI (50 e 100 mg/Kg) sobre a memória de trabalho (Y-maze) de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.



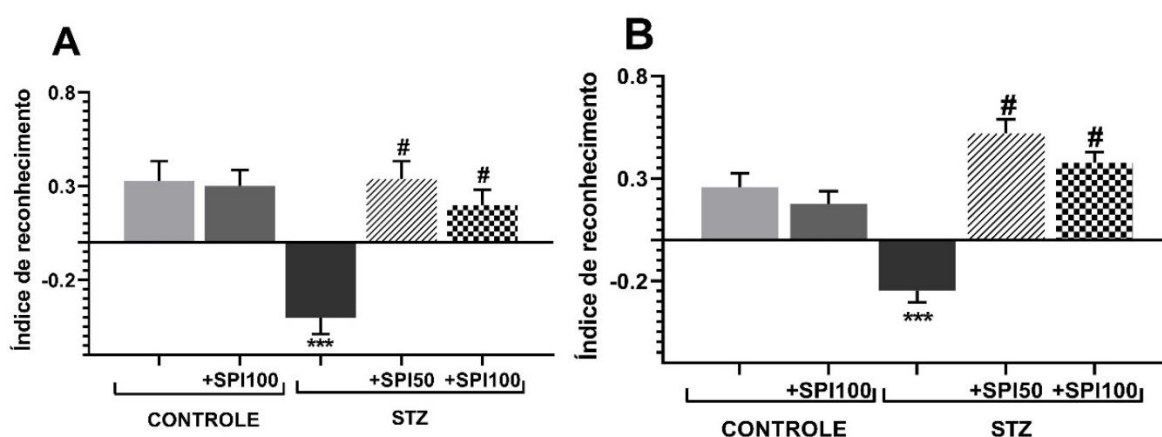
Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. aCSF. # $P < 0,001$ vs STZ. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni ($n = 11$). Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

5.2.3 Efeito do extrato aquoso de SPI (50 e 100 mg/Kg) sobre a memória episódica (teste de reconhecimento de objetos) em camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.

Os animais submetidos ao modelo DAE induzido por injeções ICV-STZ demonstraram déficit na capacidade de reconhecer um novo objeto na memória recente 1 hora após o treinamento (memória curto prazo), em comparação com os animais controle (índice de reconhecimento: controle: $0,32 \pm 0,10$; $0,30 \pm 0,08$; STZ: $-0,40 \pm 0,08$), apresentando uma menor taxa de reconhecimento. Esta deficiência foi significativamente diminuída pelo tratamento com SPI em ambas as doses (índice de reconhecimento: STZ + SPI50: $0,33 \pm 0,09$; STZ + SPI100: $0,19 \pm 0,08$ $p < 0,0001$) (Figura 18A).

Os animais submetidos ao modelo DAE induzido por injeções ICV-STZ tiveram um comprometimento significativo em sua capacidade de reconhecer um novo objeto 24 horas após o treinamento (memória longo prazo) (índice de reconhecimento: controle: $0,25 \pm 0,06$; STZ: $-0,24 \pm 0,05$) em comparação com os animais controles. O tratamento com SPI em ambas as doses testadas reduziu consideravelmente esse comprometimento (índice de reconhecimento: STZ + SPI50: $0,51 \pm 0,06$; STZ + SPI100: $0,37 \pm 0,05$, $p < 0,0001$) (Figura 18B).

Figura 18. Efeito da SPI (50 e 100 mg/Kg) sobre a memória episódica (teste de reconhecimento de objetos) em camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.



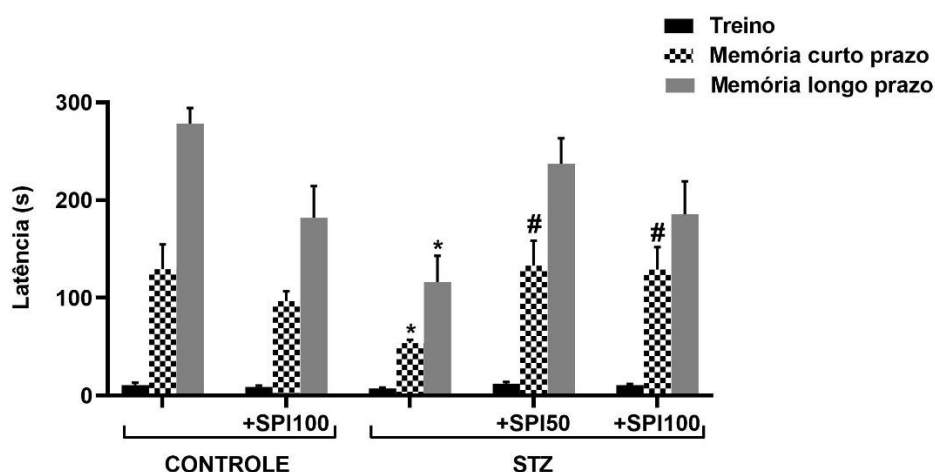
Memória episódica curto prazo (A); memória episódica longo prazo (B). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. *** $p < 0,0001$ vs. controle. # $p < 0,0001$ vs STZ. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni ($n = 11-12$). Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

5.2.4 Efeito do extrato aquoso de SPI (50 e 100 mg/Kg) sobre a memória aversiva recente e tardia (teste da esquiva passiva) em camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.

Quando comparados ao grupo controle, os animais submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ apresentaram déficits significativos na memória de curto prazo (controle: $129,4 \pm 25,25$; STZ: $53,7 \pm 3,57$), como na memória de longo prazo (controle: $276,2 \pm 16,2$; STZ: $116,2 \pm 26,7$ $p < 0,05$). Esse déficit foi prevenido pelo tratamento com SPI em ambas as doses avaliadas no curto prazo (STZ + SPI50: $131,9 \pm 25,66$; STZ + SPI100: 129 ± 23 ; STZ: $53,7 \pm 3,57$, $p < 0,05$), mas esse efeito não foi observado na memória de longo prazo, não havendo diferença significativa entre os grupos tratados com SPI 50 e 100 mg/Kg, quando comparado ao

grupo STZ. Não houve diferença estatística entre os grupos nas latências dos animais no treino (Figura 19).

Figura 19. Efeito da SPI (50 e 100 mg/Kg) sobre a memória aversiva recente e tardia (teste da esQUIVA passiva) em camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.



Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0.05$ vs. controle. # $p < 0.05$ vs STZ. Teste de Kruskal Wallis seguindo do teste de Dunn's ($n = 8 - 11$). Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

5.2.5 Efeito do extrato aquoso de SPI (50 e 100 mg/Kg) sobre a memória espacial (Teste do Labirinto Aquático) em camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.

Na avaliação da aprendizagem espacial através do labirinto aquático, os animais que receberam injeções ICV-STZ apresentaram déficits na memória espacial, medida pelo parâmetro latência para alcançar a plataforma em segundos (Latência: controle: $15,45 \pm 3,60$; STZ: $38,30 \pm 6,04$, $p < 0,05$) (Figura 20A), demorando mais para chegar à plataforma do que os do grupo controle. Embora o tratamento com SPI tenha causado redução dessa latência, não foi estatisticamente significativo.

Quanto ao número de cruzamentos no local da plataforma, houve diferenças significativas entre os grupos. Os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram déficits na memória espacial, avaliada através do número de cruzamentos no local da plataforma (Número de cruzamentos: controle: $6,66 \pm 0,58$; STZ: $3,38 \pm 0,78$, $p < 0,05$), demonstrando um menor número de cruzamentos na área da plataforma, quando comparados aos animais do grupo controle. Os animais

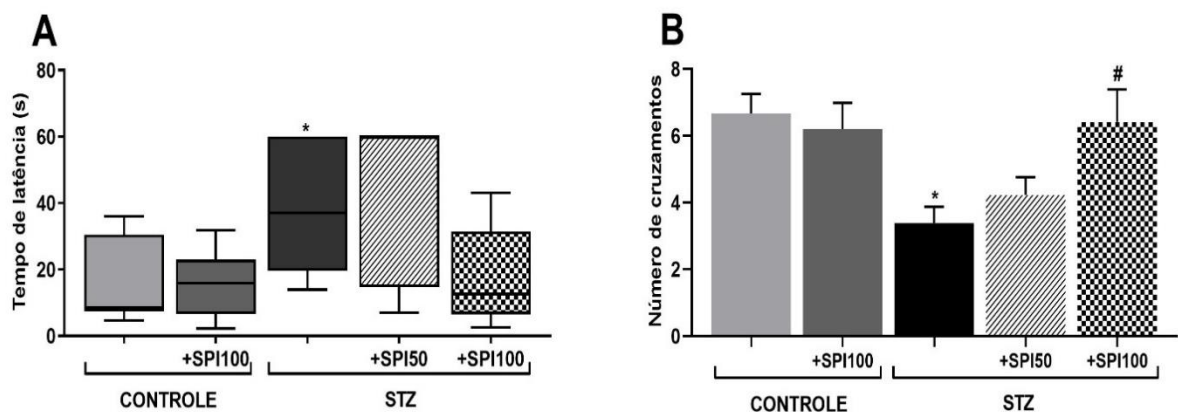
tratados com o SPI na dose de 100 mg/kg apresentaram um aumento significativo no número de cruzamentos quando comparados ao grupo STZ (Número de cruzamentos: STZ + SPI100: $6,41 \pm 0,97$, $p < 0,05$) (Figura 20B).

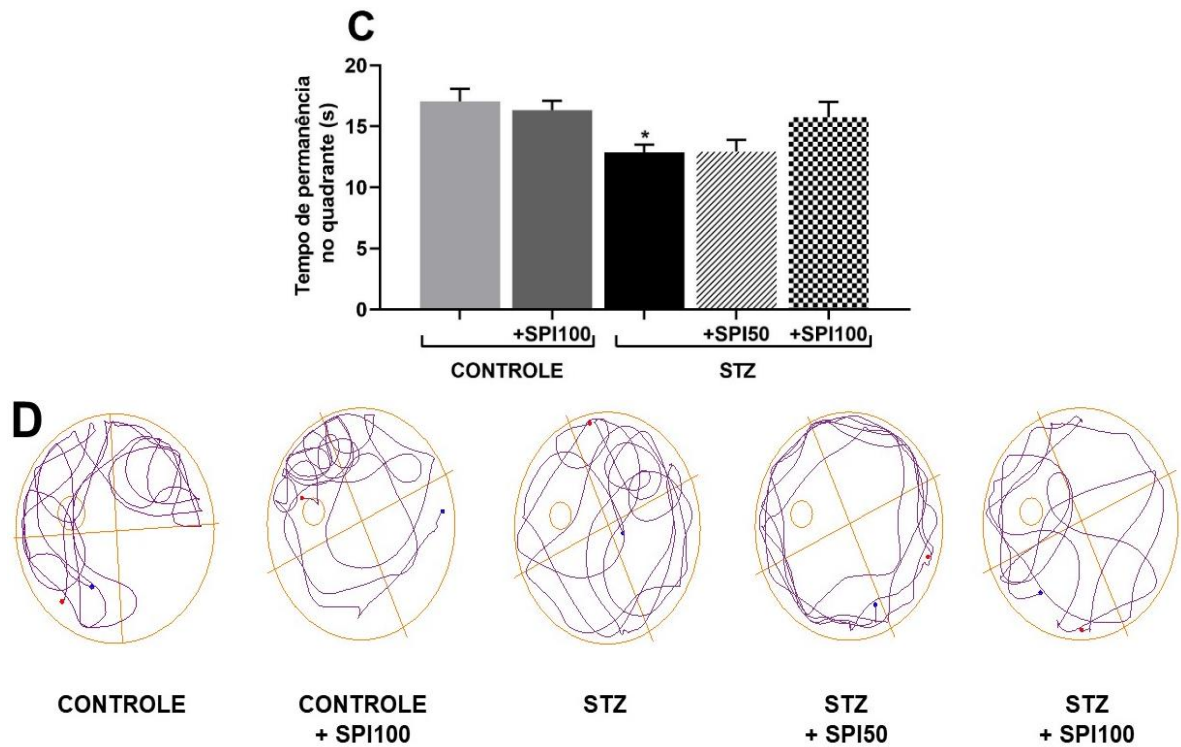
Com relação ao tempo de permanência no quadrante, os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram uma diminuição no tempo de permanência em segundos (Tempo de permanência no quadrante: controle: $17,05 \pm 1,03$; STZ: $12,89 \pm 0,77$; $p < 0,05$). O tratamento com SPI não promoveu um aumento significativo no tempo de permanência no quadrante (Figura 20C). A Figura 20D mostra rastreamento dos diferentes grupos analisado através do ANY-maze.

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quanto à distância percorrida pelos animais (distância percorrida em metros, controle: $22,44 \pm 0,79$; controle + SPI100: $19,44 \pm 0,61$; STZ: $21,17 \pm 1,15$; STZ + SPI50: $19,61 \pm 0,76$; STZ + SPI100: $19,60 \pm 0,65$) (Figura 20E).

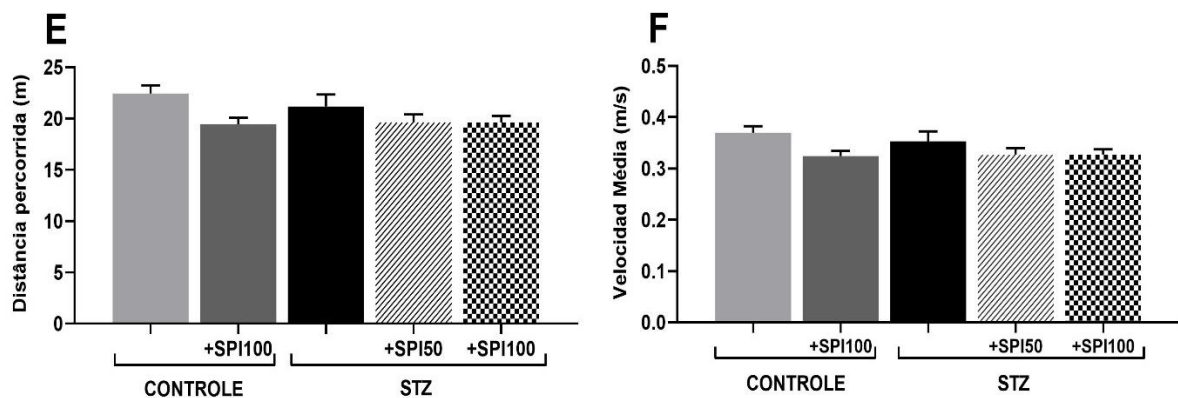
No tocante à velocidade média dos animais, também não houve diferença estatística entre os grupos (velocidade média em m/s, controle: $0,36 \pm 0,012$; controle + SPI100: $0,32 \pm 0,010$; STZ: $0,35 \pm 0,019$; STZ + SPI50: $0,32 \pm 0,012$; STZ + SPI100: $0,32 \pm 0,010$) (Figura 19F).

Figura 20. Efeito da SPI (50 e 100 mg/Kg) sobre a memória espacial (Teste do Labirinto Aquático), avaliada através dos parâmetros: latência para alcançar a plataforma (A), número de cruzamento (B), tempo de permanência no quadrante (C), gráficos de rastreamento dos diferentes grupos analisado através do ANY-maze (D), distância percorrida (E) e velocidade média (F).





(A) Os resultados estão expressos como mediana min-max. * $p < 0.05$ vs. controle. Teste de Kruskal Wallis seguindo do teste de Dunn's. (B) Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. controle. # $p < 0,05$ vs STZ. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. (C) Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. aCSF. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni, ($n = 11 - 12$). Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).



Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM, ($n = 10$). Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

5.2.6 Efeito do extrato aquoso de SPI (50 e 100 mg/Kg) sobre a ansiedade (Labirinto em cruz elevado) em camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.

A análise de variância ANOVA mostrou que as ICV-STZ, bem com o tratamento com SPI nas doses de 50 e 100 mg não geraram diferenças significativas na porcentagem de entrada e de tempo nos braços abertos do LCE (Tabela 3). Com relação ao número absoluto de entradas e tempo nos braços abertos também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

Além disso, nenhuma das doses alterou a atividade locomotora dos animais, o que foi detectado avaliando o número de entradas nos braços fechados e o número total de entradas em ambos os braços.

Tabela 3. Efeito do extrato aquoso de SPI (50 e 100 mg) sobre o número de entradas e tempo nos braços abertos (valores absolutos), número de entradas nos braços fechados, número total de entradas do LCE e percentual de tempo e entrada nos braços abertos, em camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.

Grupos	Parâmetros Analisados						
	Nº entradas nos BA	Tempo nos BA (s)	Nº entradas nos BF	Tempo nos BF (s)	Nº total de entradas (BA + BF)	% Entradas nos BA	% tempo nos BA
Controle	24,0 ± 2,51	151,4 ± 16,3	23,5 ± 1,23	137,3 ± 20,3	47,5 ± 1,85	50,0 ± 3,71	52,82 ± 5,93
Controle + SPI100	19,3 ± 1,17	162,3 ± 7,59	19,5 ± 1,23	137,7 ± 7,59	38,8 ± 2,41	50,2 ± 2,83	54,09 ± 2,53
STZ	21,0 ± 1,17	173,6 ± 11,8	15,8 ± 2,21	114,1 ± 8,88	38,1 ± 1,89	57,8 ± 4,32	61,84 ± 4,67
STZ +SPI50	22,7 ± 1,87	138,6 ± 16,4	27,1 ± 2,85	120,9 ± 10,4	46,5 ± 3,15	49,5 ± 3,78	47,12 ± 5,49
STZ +SPI100	25,1 ± 2,48	144,4 ± 20,9	21,5 ± 3,08	112,4 ± 18,3	47,1 ± 4,19	54,1 ± 4,74	48,14 ± 6,98

Os dados representam a média ± EPM. Análise estatística: ANOVA seguida de teste de Bonferroni (N= 8 - 11). Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*); Segundos (s); Braço aberto (BA); Braço Fechado (BF).

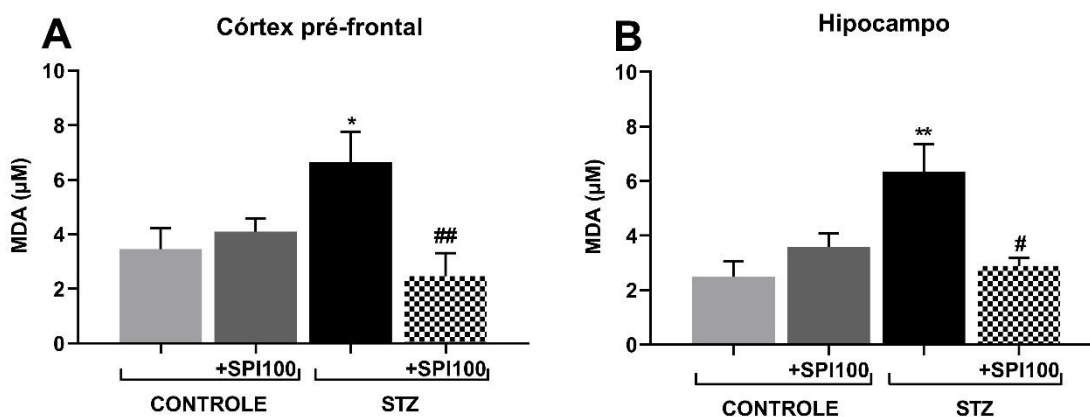
5.3 Avaliação bioquímica

5.3.1 Efeito do extrato aquoso de SPI (100 mg/Kg) sobre a peroxidação lipídica avaliado através da dosagem de (MDA) em tecidos cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.

Os animais submetidos às injeções ICV-STZ apresentaram um aumento, significativo, nas concentrações de MDA, no córtex pré-frontal e hipocampo. No córtex pré-frontal (MDA (μM) controle: $3,45 \pm 0,76$; STZ: $6,63 \pm 1,11$ $p < 0,05$) (Figura 21A) e hipocampo (MDA (μM) controle: $2,48 \pm 0,29$; STZ: $6,34 \pm 1,00$ $p < 0,05$) (Figura 21B).

O tratamento com o SPI foi capaz de diminuir significativamente o aumento da concentração de MDA, nas duas regiões cerebrais avaliadas, córtex pré-frontal (MDA (μM): STZ: $6,63 \pm 1,11$; STZ + SPI100: $2,45 \pm 0,85$, $p < 0,05$) e hipocampo (MDA (μM): STZ: $6,34 \pm 1,00$; STZ + SPI100: $2,88 \pm 0,29$, $p < 0,005$).

Figura 21. Efeito da SPI (100 mg/Kg) sobre a peroxidação lipídica avaliado através da dosagem de MDA no córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B) de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.

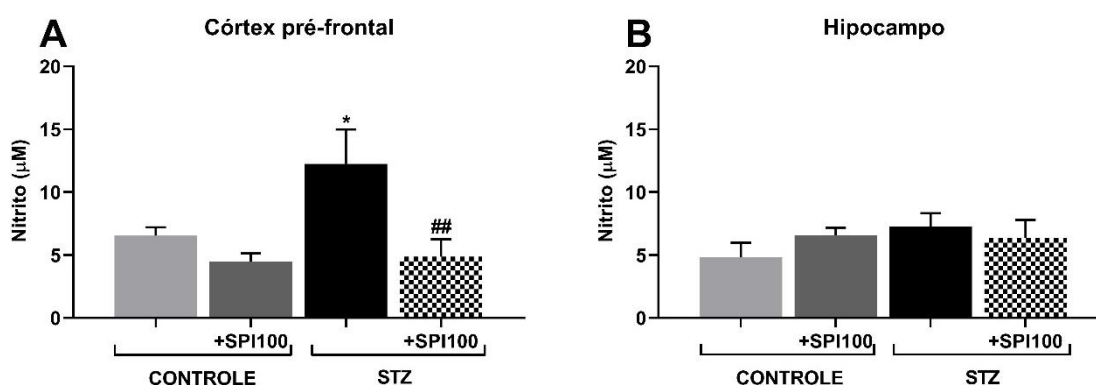


Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Controle. # $p < 0,05$ vs STZ. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni, ($n = 6-7$). Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

5.3.2 Efeito do extrato aquoso de SPI (100 mg/Kg) sobre a dosagem de nitrito/nitrato (NO_2/NO_3) em tecidos cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.

Na avaliação da dosagem de nitrito/nitrato no córtex pré-frontal e hipocampo, os animais submetidos às injeções ICV-STZ apresentaram um aumento significativo nas concentrações de nitrito, no córtex pré-frontal (nitrito (μM): controle: $5,86 \pm 0,87$; STZ: $12,23 \pm 2,76$, $p < 0,05$) (Figura 22A). O tratamento com o SPI foi capaz de diminuir o aumento da concentração de nitrito no córtex pré-frontal (Figura 22A) (nitrito (μM): STZ: $12,23 \pm 2,76$; STZ + SPI50: $4,52 \pm 0,46$; STZ + SPI100: $4,86 \pm 1,38$ $p < 0,005$, mas não no hipocampo (Figura 22B).

Figura 22. Efeito da SPI (100 mg/Kg) sobre a dosagem de nitrito/nitrato (NO_2/NO_3) no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.

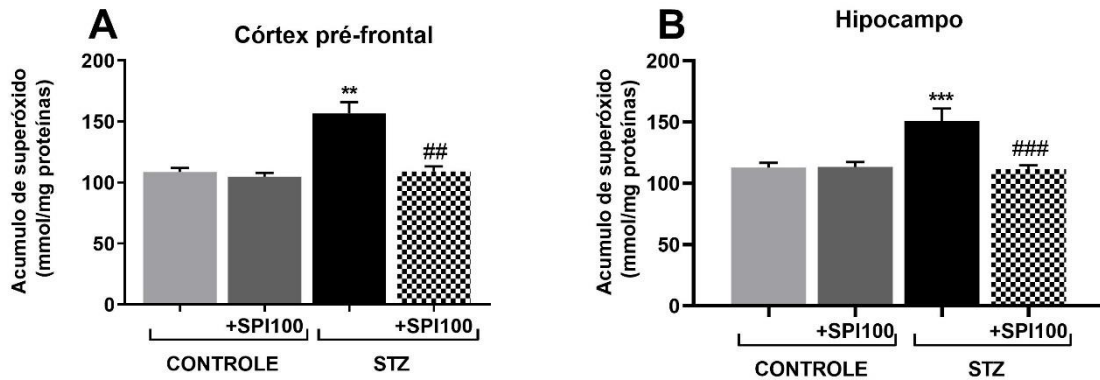


Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Controle. ## $p < 0,005$ vs STZ. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni, ($n = 5 - 7$). Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

5.3.3 Efeito do extrato aquoso de SPI (100 mg/Kg) sobre a acumulação de superóxido avaliada por medição indireta de atividade de superóxido dismutase (SOD).

Os animais submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ apresentaram um aumento significativo no acúmulo de superóxido no córtex pré-frontal (controle: $108,6 \pm 3,31$; STZ: $156,6 \pm 9,37$ $p < 0,0001$) e hipocampo (controle: $112,9 \pm 3,31$; STZ: $151 \pm 10,0$; $p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle. O tratamento com SPI foi capaz de prevenir esse acúmulo no córtex pré-frontal (STZ: $151 \pm 10,0$; STZ + SPI100: $109,1 \pm 4,14$, $p < 0,0005$) e hipocampo (STZ: $151 \pm 10,0$; STZ + SPI100: $111,5 \pm 3,30$, $p < 0,0001$) (Figura 23A e 23B), indicando a ação antioxidante do SPI.

Figura 23. Efeito da SPI (100 mg/Kg) sobre a acumulação de superóxido avaliada por medições indireta de atividade de superóxido dismutase (SOD) de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.

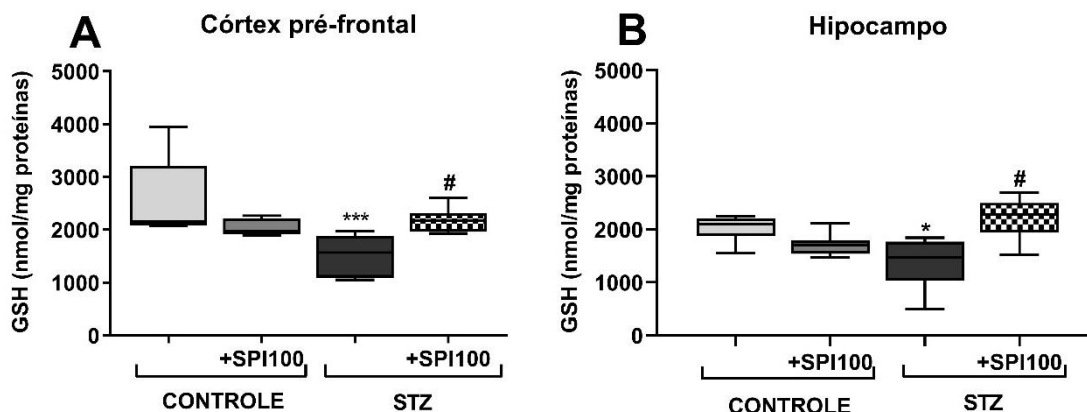


Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. ** $p < 0,0005$, *** $p < 0,0001$ vs. Controle. ## $p < 0,0005$, ### $p < 0,0001$ vs STZ. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni, ($n = 8-9$). Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

5.3.4 Efeito do extrato aquoso de SPI (100 mg/Kg) sobre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) em tecidos cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.

Na avaliação da dosagem de glutathiona reduzida (GSH) no córtex pré-frontal e hipocampo, os animais submetidos às injeções de ICV-STZ apresentaram uma depleção significativa dos níveis de GSH, no córtex pré-frontal (GSH (μ g): controle: $2542 \pm 266,6$; STZ: $1512 \pm 134,6$ $p < 0,05$) (Figura 24A) e hipocampo (GSH (μ g): controle $2032 \pm 104,2$; STZ: $1363 \pm 163,0$ $p < 0,05$) (Figura 24B) quando comparado ao grupo controle. O tratamento com SPI100 mg/Kg preveniu essa alteração no córtex pré-frontal (STZ: $2542 \pm 266,6$; STZ + SPI100: $2167 \pm 90,28$ $p < 0,05$) e hipocampo (STZ: $1363 \pm 163,0$; STZ + SPI100: $2208 \pm 131,6$ $p < 0,05$).

Figura 24. Efeito da SPI (100 mg/Kg) sobre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.

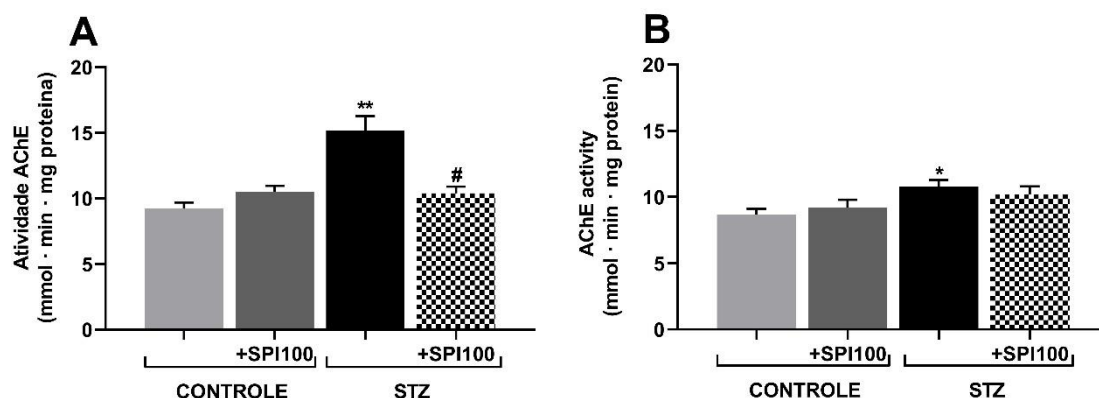


Os resultados estão expressos como mediana (mínimo e máximo). * $p < 0,05$ vs. controle, *** $p < 0,0005$ vs. Controle. # $p < 0,05$ vs STZ. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do Teste de Dunn's, ($n = 7-8$). controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

5.3.5 Efeito do extrato aquoso de SPI (100 mg/Kg) sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.

Os animais que submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ apresentaram um aumento significativo na atividade da AChE no córtex pré-frontal (AChE (nmol): controle: $9,22 \pm 0,45$; STZ: $15,17 \pm 1,10$ $p < 0,0005$) (Figura 25A) e hipocampo (AChE (nmol): controle: $8,68 \pm 0,44$; STZ: $10,76 \pm 0,50$ $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle (Figura 25B). No córtex pré-frontal esse aumento foi reduzido pelo tratamento com SPI 100 mg/kg (STZ: $14,92 \pm 1,00$; STZ + SPI100: $10,27 \pm 1,29$ $p < 0,05$).

Figura 25. Efeito do tratamento com SPI (100 mg/Kg, v.o.) sobre a atividade da AChE no córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B) de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.



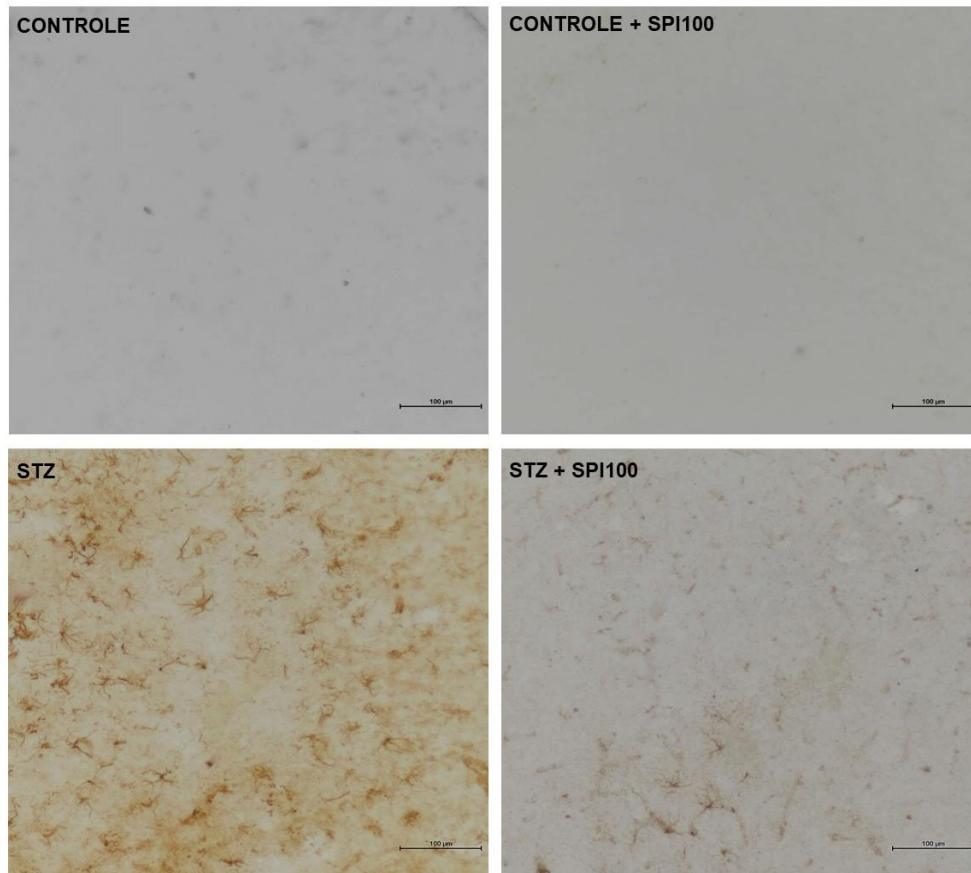
Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,0005$ vs. controle. # $p < 0,05$ vs STZ. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni, ($n = 5$). Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

5.4 Análises histopatológicas

5.4.1 Efeito do extrato aquoso de SPI (100 mg/Kg) sobre a ativação de astrócitos evidenciada através da imunomarcagem para GFAP no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.

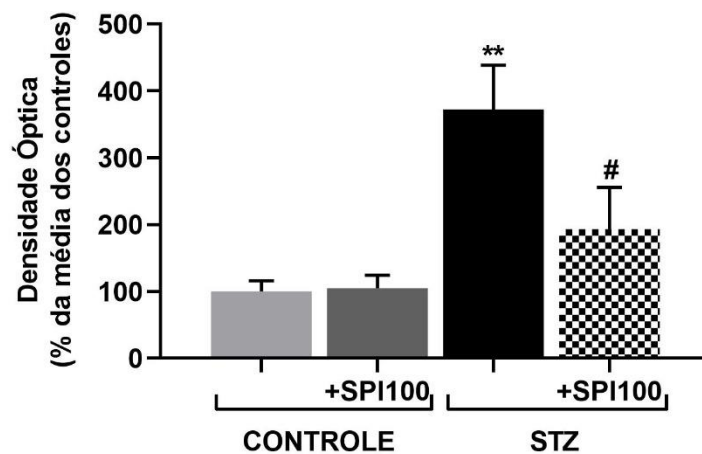
O grupo STZ apresentou um aumento significativo na imunorreatividade para GFAP, demonstrado uma astrogliose no córtex pré-frontal (% da média em relação aos controles (controle: $100,0 \pm 15,85$; STZ: $372,4 \pm 66,39$ $p < 0,005$) (Figuras 27 e 28) e hipocampo - CA1 (controle: $100,0 \pm 15,26$; STZ: $256,9 \pm 35,93$ $p < 0,0001$), CA3 (controle: $100,0 \pm 14,47$; STZ: $293,7 \pm 60,17$ $p < 0,005$) e GD (controle: $97,60 \pm 20,94$; STZ: $241,3 \pm 52,11$ $p < 0,05$) (Figuras 26 e 27), em relação ao controle. O tratamento com SPI100 mg/kg diminuiu significativamente o aumento da imunorreatividade para GFAP no córtex pré-frontal (STZ: $372,4 \pm 66,39$; STZ + SPI100: $193,1 \pm 62,89$ $p < 0,05$) (Figuras 27 e 28) e no hipocampo CA1 (STZ: $256,9 \pm 35,93$; STZ + SPI100: $72,94 \pm 12,06$ $p < 0,0001$), CA3 (STZ: $293,7 \pm 60,17$; STZ + SPI100: $108,0 \pm 21,31$ $p < 0,005$) e GD (STZ: $241,3 \pm 52,11$; STZ + SPI100: $76,43 \pm 17,41$, $p < 0,05$) (Figuras 28 e 29).

Figura 26. Fotomicrografias representativas do efeito da SPI (100 mg/Kg, v.o.) sobre a imunorreatividade para GFAP no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.



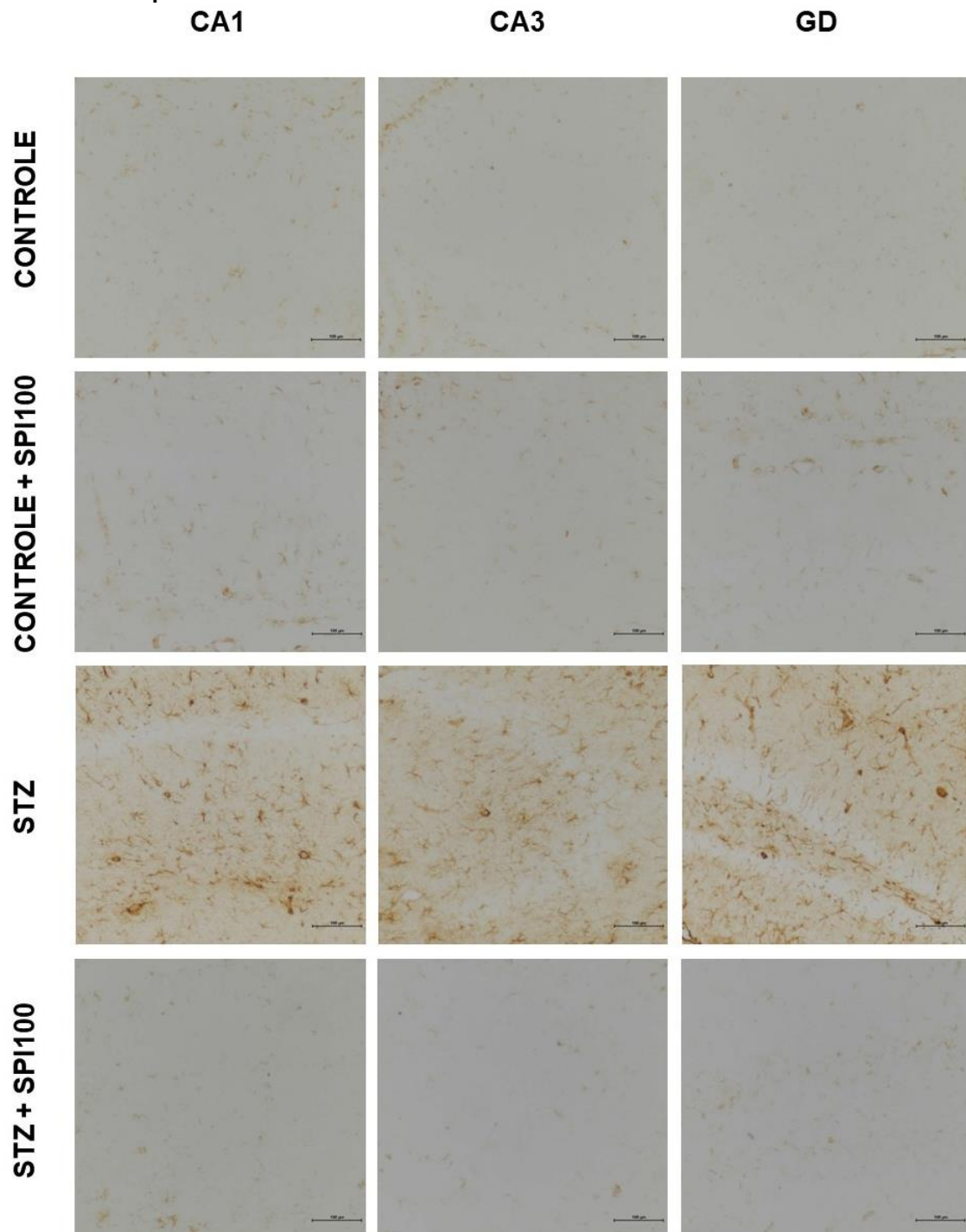
Aumento de 100x. Barra de escala corresponde a 100µm. Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

Figura 27. Efeito do tratamento com SPI (100 mg/kg, v.o.) sobre a imunorreatividade para GFAP (astrócitos) no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por STZ.



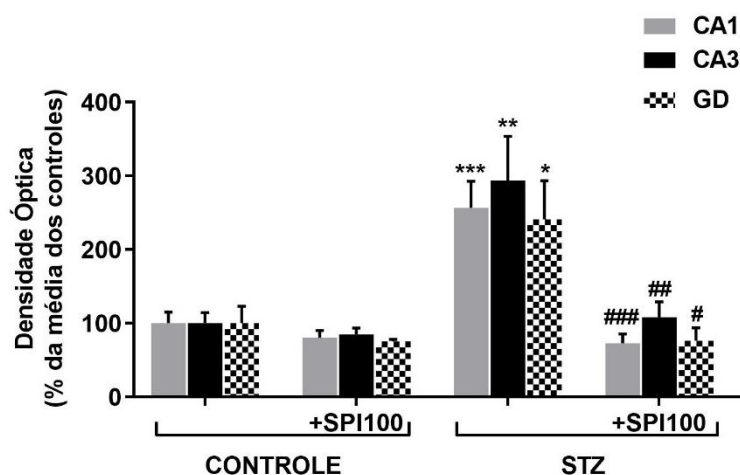
Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. ** $p < 0,005$ vs. Controle. # $p < 0,05$ vs STZ. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni, ($n = 5$). Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

Figura 28. Fotomicrografias representativas do efeito da SPI (100 mg/Kg, v.o.) sobre a imunorreatividade para GFAP no hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ



Aumento de 100x. Barra de escala corresponde a 100µm. controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

Figura 29. Efeito do tratamento com SPI (100 mg/Kg, v.o.) sobre a imunorreatividade para GFAP (astrócitos) no hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.

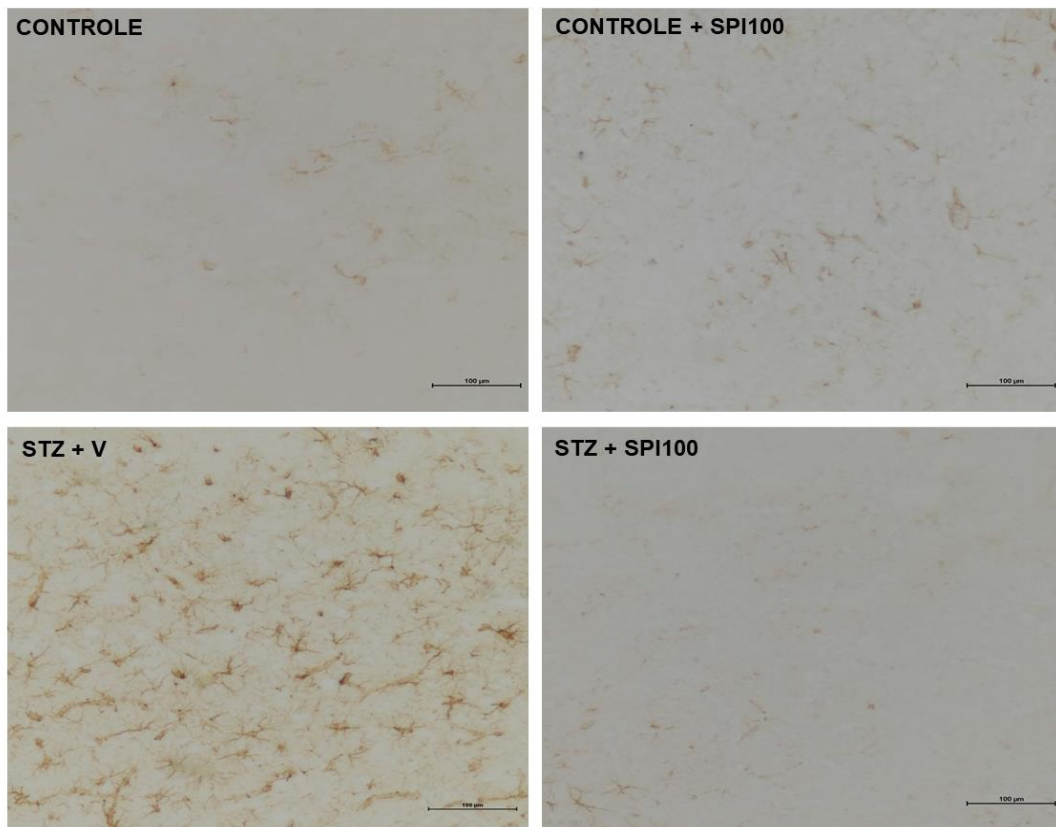


Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ vs. aCSF. ### $p < 0,0001$, ## $p < 0,005$ e # $p < 0,05$ vs STZ. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni, ($n = 5$). Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

5.4.2 Efeito do extrato aquoso de SPI (100 mg/Kg) sobre a ativação microglial evidenciada através da imunomarcagem para IBA-1 no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.

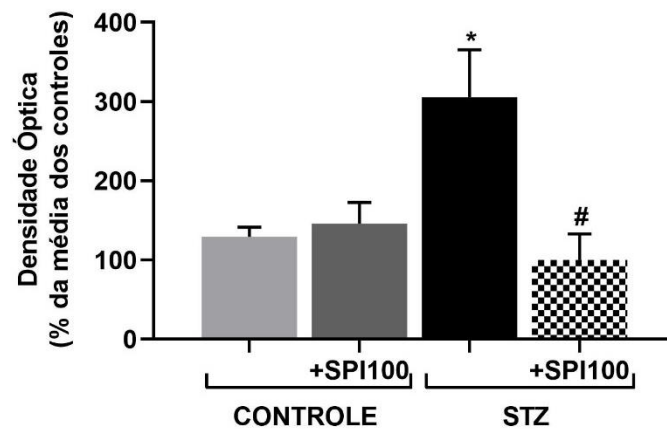
O grupo STZ demonstrou um aumento significativo na imunorreatividade para IBA-1, demonstrando uma microgliose no córtex pré-frontal (% da média em relação aos controles (controle: $129,3 \pm 12,01$; STZ: $305,7 \pm 59,69$ $p < 0,05$) (Figuras 30 e 31) e no hipocampo CA1 (controle: $93,09 \pm 15,49$; STZ: $154,1 \pm 8,66$ $p < 0,05$), CA3 (controle: $100,5 \pm 10,55$; STZ: $140,1 \pm 6,85$) e GD (controle: $96,30 \pm 10,46$; STZ: $134,7 \pm 7,76$; $p < 0,05$) (Figuras 32 e 33), em relação aos controles. O tratamento com SPI 100 mg/kg diminuiu significativamente o aumento da imunorreatividade para IBA-1 no córtex pré-frontal (STZ: $372,4 \pm 66,39$; STZ + SPI100: $100,0 \pm 32,89$ $p < 0,005$) (Figuras 31 e 32) no hipocampo CA1 (STZ: $154,1 \pm 8,66$; STZ + SPI100: $72,22 \pm 13,66$ $p < 0,005$), CA3 (STZ: $140,1 \pm 6,85$; STZ + SPI100: $59,04 \pm 11,10$ $p < 0,005$) e GD (STZ: $134,7 \pm 7,76$; STZ + SPI100: $68,35 \pm 16,97$ $p < 0,005$).

Figura 30. Fotomicrografias representativas do efeito do tratamento com SPI (100 mg/Kg, v.o.) sobre a imunorreatividade para IBA-1 no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.



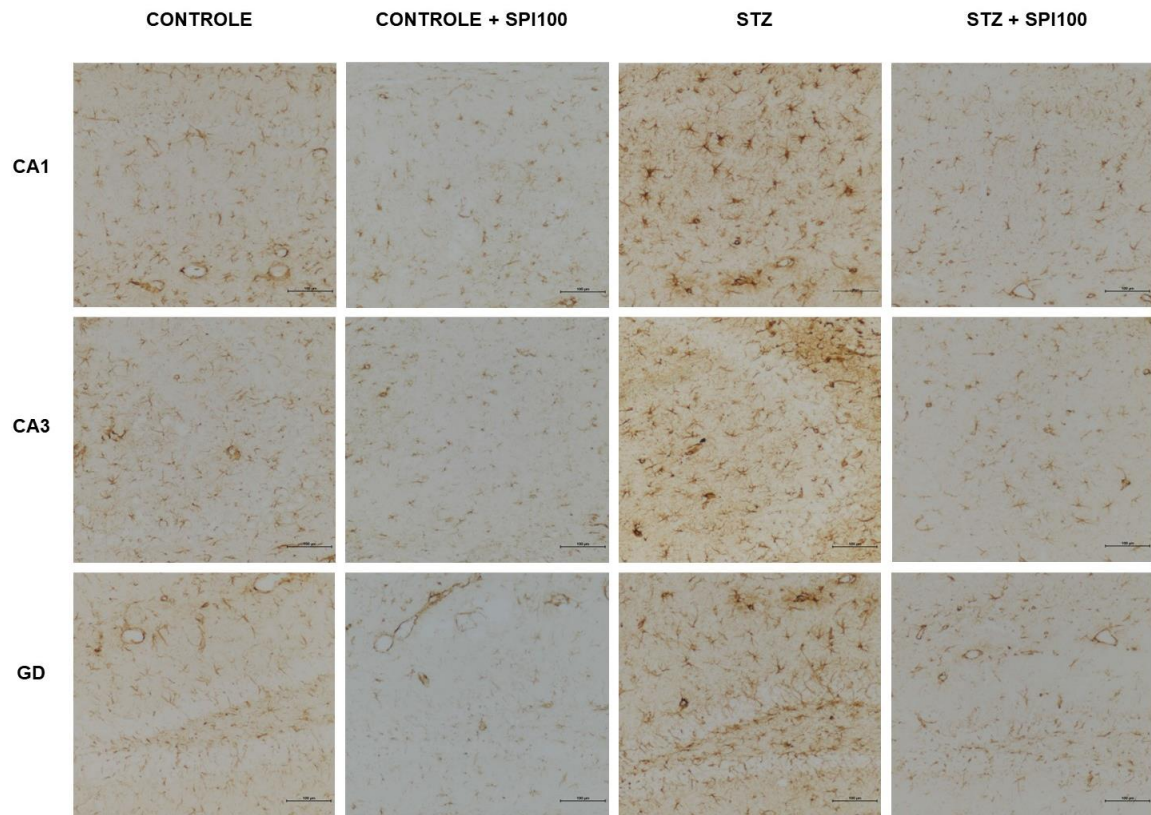
Aumento de 100x. Barra de escala corresponde a 100µm. Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

Figura 31. Efeito do tratamento com SPI (100 mg/Kg, v.o.) sobre a imunorreatividade para IBA-1 (micróglia) no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.



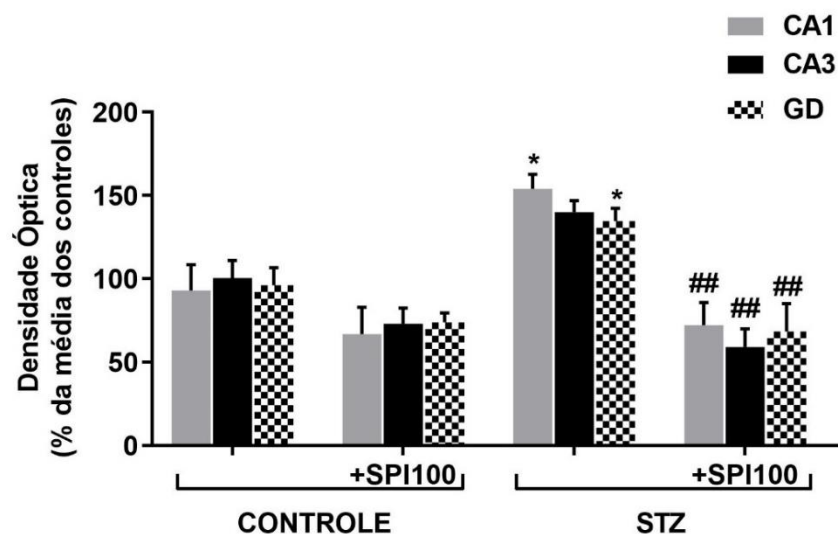
Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. aCSF. ## $p < 0,005$ vs STZ. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni, ($n = 5$). Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

Figura 32. Fotomicrografias representativas do efeito do tratamento com SPI (100 mg/Kg, v.o.) sobre a imunorreatividade para IBA-1 no hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ



Aumento de 100x. Barra de escala corresponde a 100µm. Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

Figura 33. Efeito do tratamento com SPI (100 mg/Kg, v.o.) sobre a imunorreatividade para IBA-1 (micróglia) no hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.

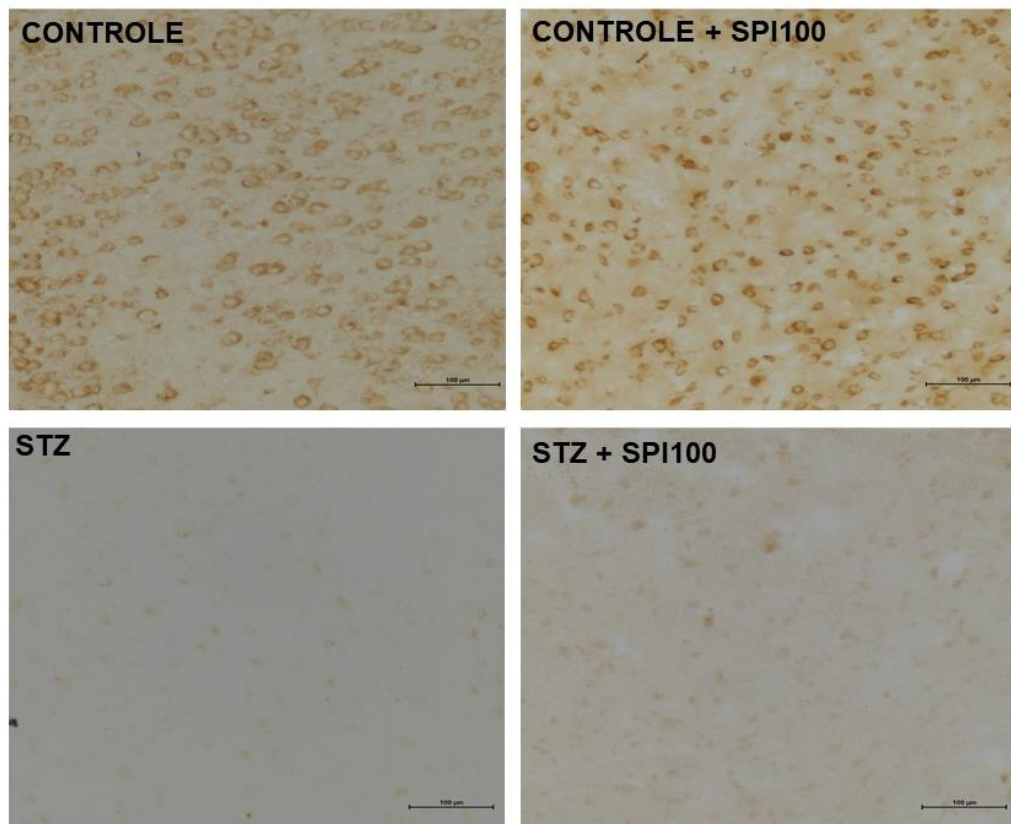


Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Controle. ## $p < 0,005$ vs STZ. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni, ($n = 5$). Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

5.4.3 Efeito do extrato aquoso de SPI (100 mg/Kg) sobre a plasticidade sináptica evidenciada através da imunomarcção do número de neurônios imunorreativos para BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.

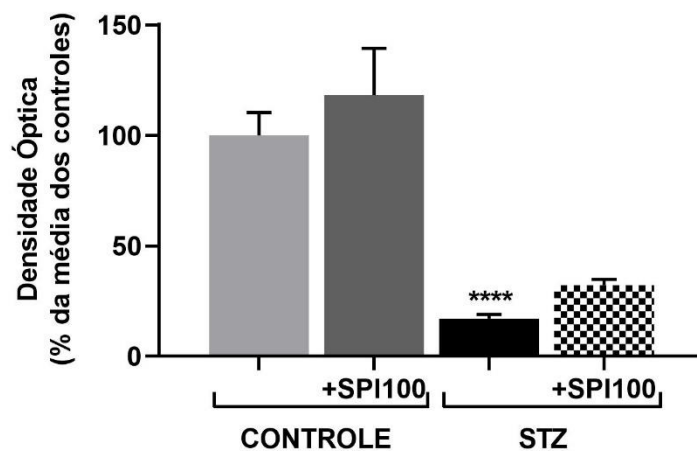
O tratamento com ICV-STZ causou uma queda significativa do número de neurônios imunorreativos para BDNF, indicando uma provável depleção do fator neurotrófico derivado do cérebro no córtex pré-frontal (% da média em relação aos controles (controle: $100,0 \pm 10,32$; STZ: $16,91 \pm 1,96$ $p < 0,0001$) (Figuras 34 e 35) e no hipocampo CA1 (controle: $100,0 \pm 9,31$; STZ: $26,6 \pm 6,68$ $p < 0,0005$), CA3 (controle: $100,0 \pm 11,51$; STZ: $19,63 \pm 2,73$ $p < 0,0005$) e GD (controle: $100, \pm 16,98$; STZ: $24,25 \pm 7,28$ $p < 0,005$) (Figuras 36 e 37), em relação aos controles. O tratamento com SPI100 mg/Kg não foi capaz de prevenir essa depleção do BDNF no córtex pré-frontal (STZ: $16,91 \pm 1,96$; STZ + SPI100: $32,17 \pm 2,64$) e no hipocampo CA1 (STZ: $26,6 \pm 6,68$; STZ + SPI100: $38,07 \pm 5,18$), CA3 (STZ: $19,63 \pm 2,73$; STZ + SPI100: $19,91 \pm 5,25$) e GD (STZ: $24,25 \pm 7,28$; STZ + SPI100: $26,14 \pm 7,28$).

Figura 34. Fotomicrografias representativas do efeito do tratamento com SPI (100 mg/Kg, v.o.) sobre a imunorreatividade para BDNF no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.



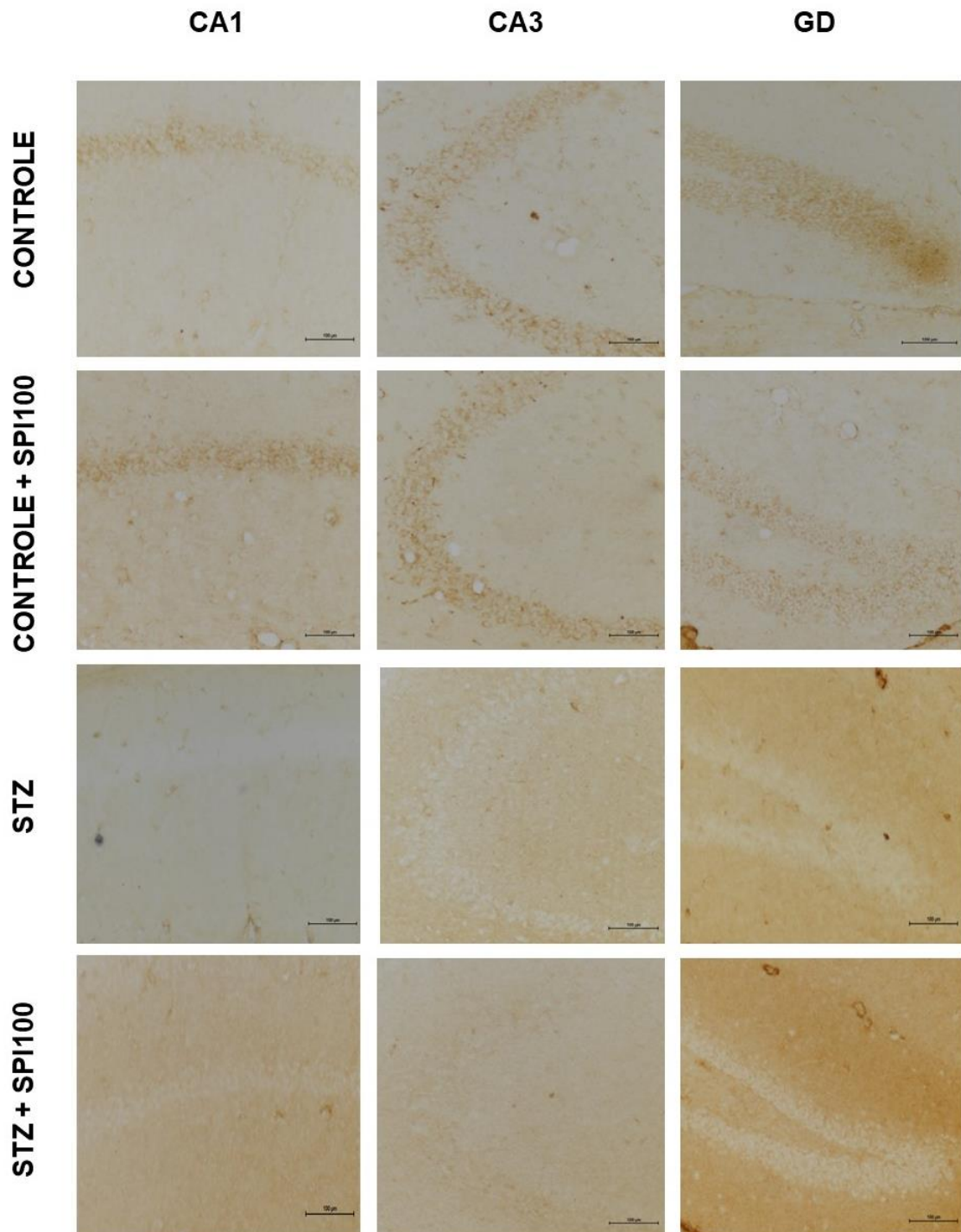
Aumento de 100x. Barra de escala corresponde a 100µm. Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

Figura 35. Efeito do tratamento com SPI (100 mg/Kg, v.o.) sobre a imunorreatividade para BDNF (Fator Neurotrófico Derivado de Cérebro) no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.



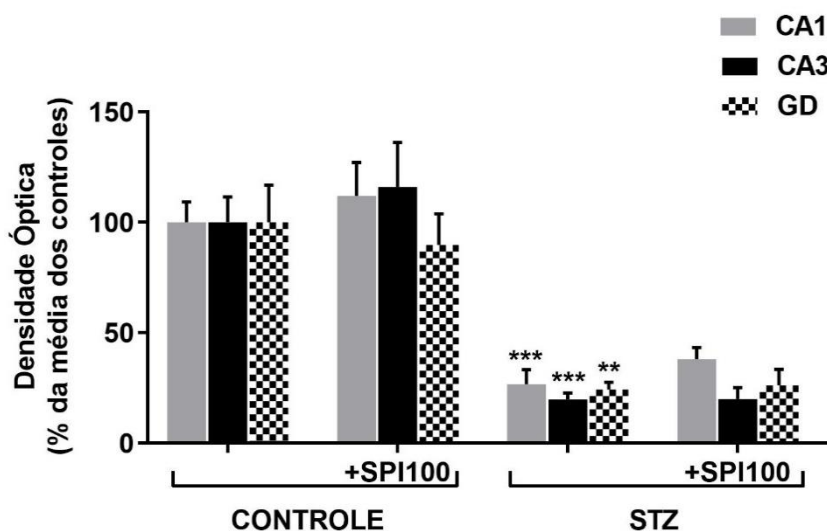
Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Controle. ### $p < 0,005$ vs STZ. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni, ($n = 5$). Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

Figura 36. Fotomicrografias representativas do efeito do tratamento com SPI (100 mg/Kg, v.o.) sobre a imunorreatividade para BDNF (Fator Neurotrófico Derivado de Cérebro) no hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ



Aumento de 100x. Barra de escala corresponde a 100µm. Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

Figura 37. Efeito do tratamento com SPI (100 mg/Kg, v.o.) sobre a imunorreatividade para BDNF (Fator Neurotrófico Derivado de Cérebro) no hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.

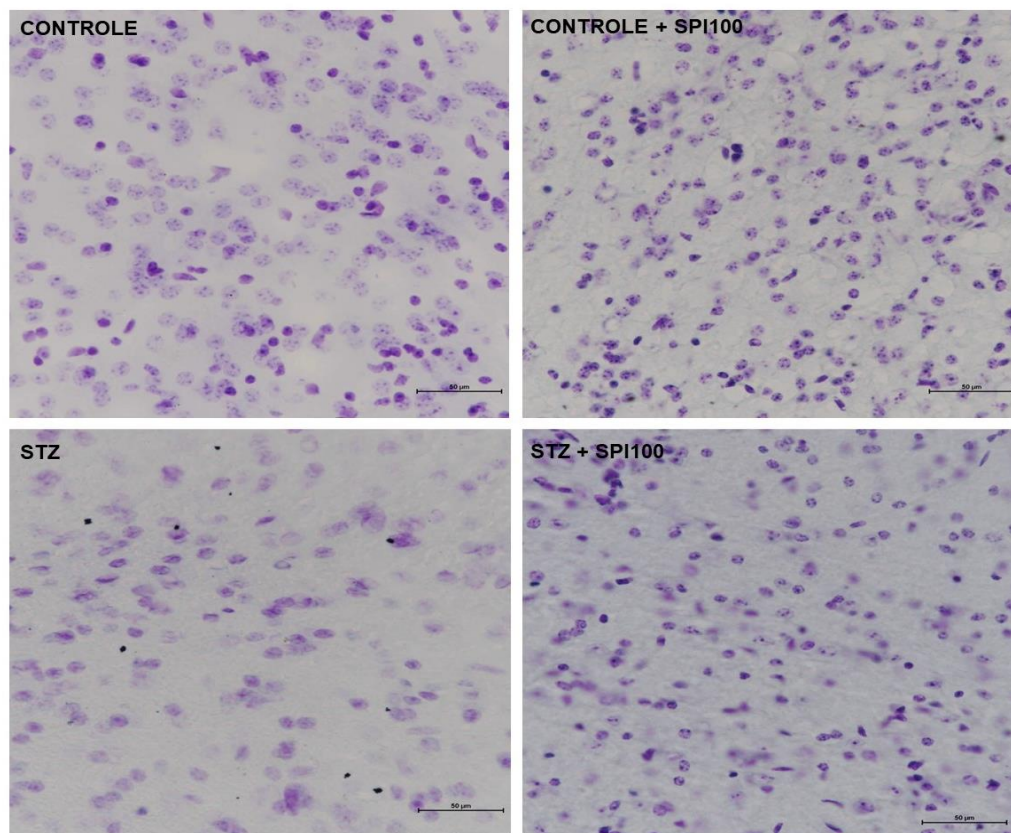


Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ vs. Controle. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni, ($n = 4-5$). Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

5.4.4 Efeito do extrato aquoso de SPI (100 mg/Kg) sobre a integridade neuronal evidenciada através da coloração com o Cresil violeta no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de ICV-STZ

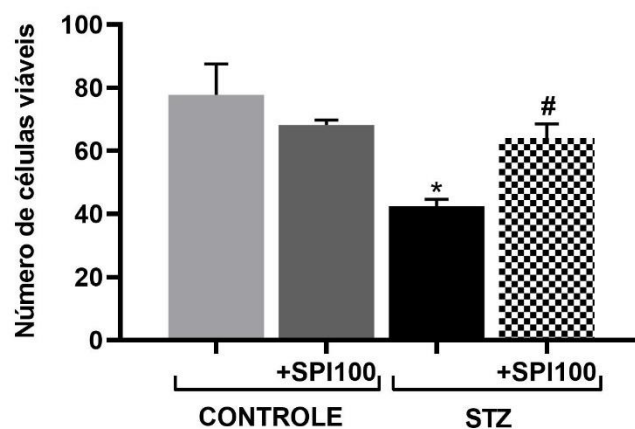
Os resultados mostraram que a administração com STZ resultou em perda neuronal (células viáveis) substancial no córtex pré-frontal (número de células viáveis: controle: $77,7 \pm 9,77$; STZ: $42,2 \pm 2,22$ $p < 0,05$) (Figuras 38 e 39) e no hipocampo CA1 (controle: $45,50 \pm 0,95$; STZ: $26,83 \pm 3,24$ $p < 0,005$), CA3 (controle: $55,67 \pm 3,37$; STZ: $32,95 \pm 4,97$ $p < 0,005$) e GD (controle: $221,0 \pm 12,27$; STZ: $130,6 \pm 20,82$ $p < 0,0005$), em relação ao grupo controle (Figuras 40 e 41). O tratamento com SPI (100 mg) preveniu, significativamente, a morte neuronal no hipocampo CA1 (STZ: $26,83 \pm 3,24$; STZ + SPI100: $40,28 \pm 5,51$ $p < 0,05$), CA3 (STZ: $32,95 \pm 4,97$; STZ + SPI100: $54,93 \pm 5,43$ $p < 0,05$) e GD (STZ: $130,6 \pm 20,82$; STZ + SPI100: $182,3 \pm 20,82$ $p < 0,05$), comparado ao grupo STZ.

Figura 38. Fotomicrografias (Cresil Violeta) do efeito do tratamento com SPI (100 mg/Kg, v.o.) sobre a viabilidade celular no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.



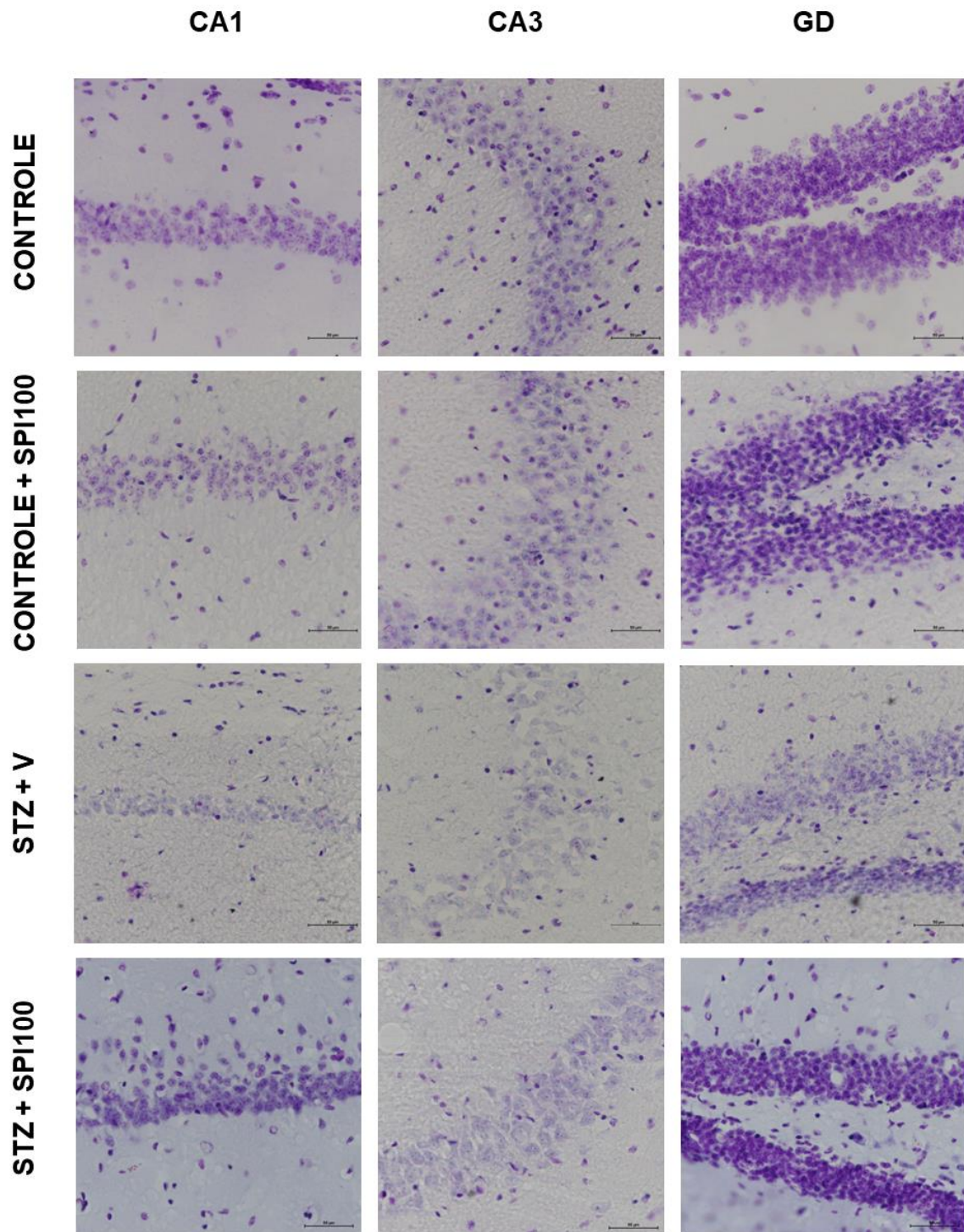
Aumento de 200x. Barra de escala corresponde a 50µm. Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

Figura 39. Efeito do tratamento com SPI (100 mg/kg, v.o.) sobre a viabilidade celular avaliada pela coloração para Cresil violeta no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por STZ.



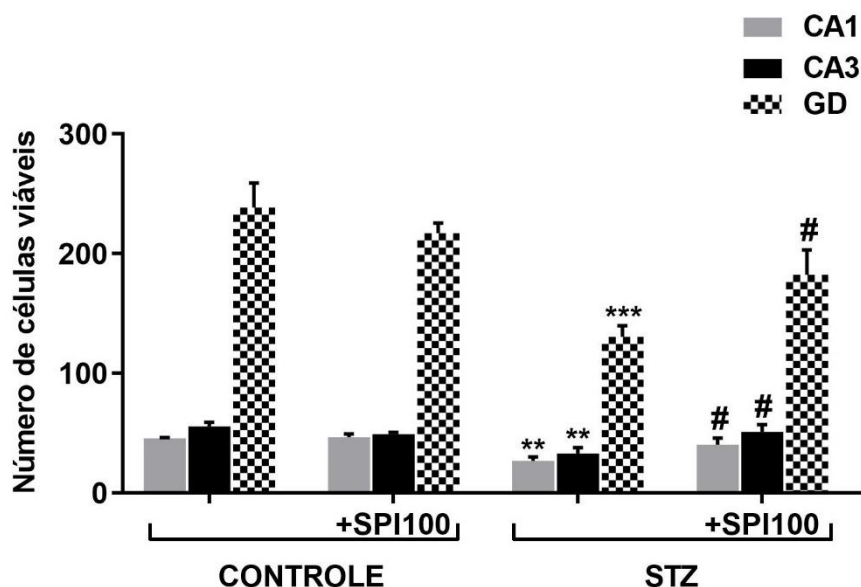
Os resultados estão expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$ vs. Controle. # $p < 0,05$ vs. STZ. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni, ($n = 5$). Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

Figura 40. Fotomicrografias (Violeta de Cresil) do efeito do tratamento com SPI (100 mg/Kg, v.o.) sobre a viabilidade celular no hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.



Aumento de 200x. Barra de escala corresponde a 50µm. Controle (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

Figura 41. Efeito do tratamento com SPI (100 mg/Kg, v.o.) sobre a viabilidade celular avaliada pela coloração para Cresil violeta no hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ.



Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ vs. controle. # $< 0,05$ vs STZ. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni, ($n = 4-5$). aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); STZ (Streptozotocina); SPI (*Spirulina*).

5.5 Experimentos *In silico*

5.5.1 Docking molecular

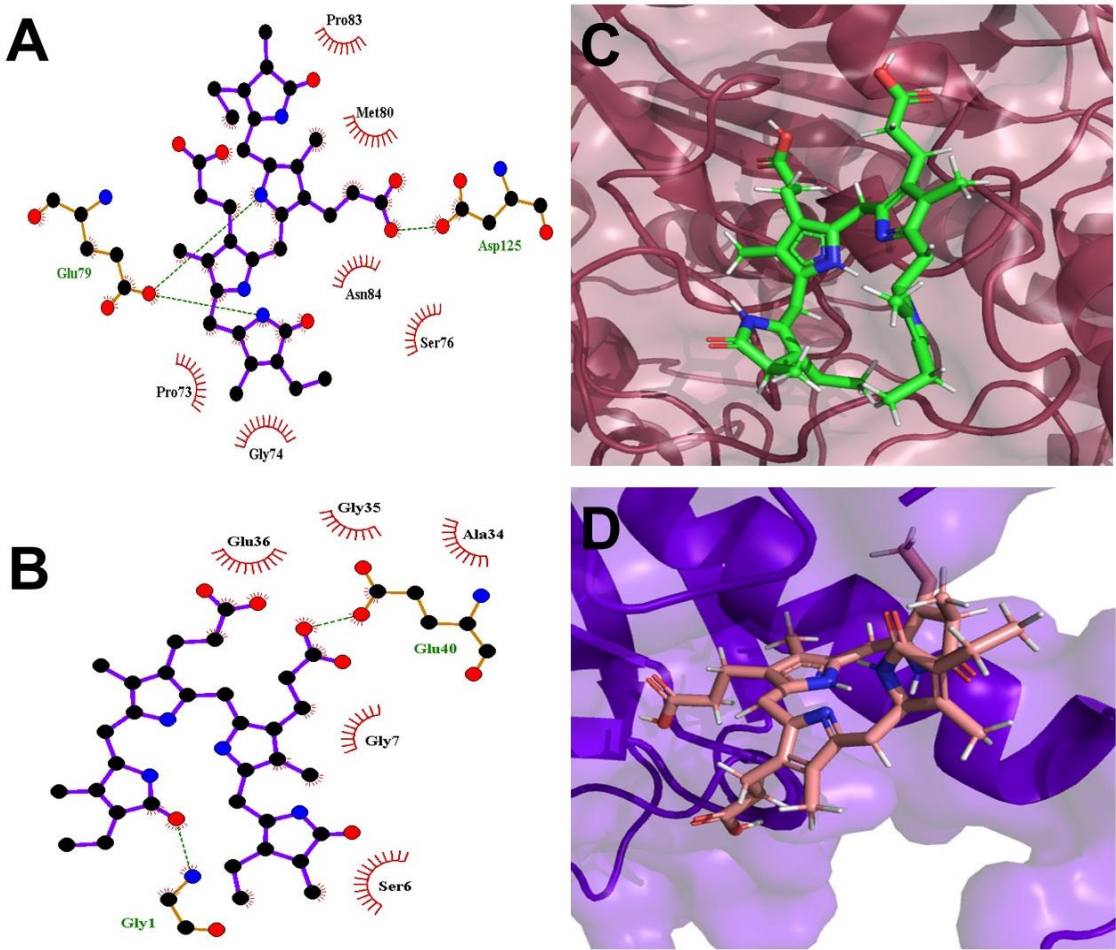
Os resultados do teste de afinidade, medidos em kcal/mol, para cada um dos *dockings* são apresentados na Tabela 4. Verificou-se que todas as interações apresentaram energia de ligação aceitáveis (abaixo de -6,0 kcal/mol), capazes de se ligar com as moléculas alvo. Os valores médios dos resultados do *docking* com a AChE foram -9.4 kcal/mol (Tabela 4) e apresentou ligações de hidrogênio com o aminoácido SER119 e diversas outras ligações hidrofóbicas (Figura 42A). Nas simulações com o alvo IRS-1 foram -7.2 kcal/mol (Tabela 4) e duas pontes de hidrogênio foram estabelecidas nas posições dos aminoácidos TRP88 e GLY112 (Figura 42B). Como resultado, foi possível detectar forças de ligações aceitáveis com uma variedade de resíduos encontrados em ambos os alvos. O resultado da interação entre os ligantes e as estruturas alvos em formato 2D e 3D são mostrados na Figura 42.

Tabela 4. Representação das energias de ligação (em kcal/mol) do *docking molecular* entre ficocianobilina e os alvos Acetilcolinesterase (AChE) e Receptor de Insulina tipo 1 (IRS1)

Alvos	Energia de ligação (ΔG) kcal/mol	Resíduos de interação	Tipo de interação
AChE	-9.4 ± 0.04	SER119	Várias ligações hidrofóbicas e Ligações de hidrogênio
IRS-1	-7.2 ± 0.22	TRP88, GLY112	Ligações de hidrogênio

Dados representado em média ± desvio padrão, calculados pelo software AutoDock Vina

Figura 42. Ilustração da interação do ligplot em 2D mostra todos os aminoácidos que constituem um contato hidrofóbico entre ficocianobilina e AChE (A) e IRS-1 (B). Ilustração tridimensional da interação entre o complexo e a enzima AChE (C) e IRS-1 (D), que são mostradas na superfície.



Modelo molecular representativo ilustrando a interação 2D AChE e ficocianobilina (A) e IRS-1 e ficocianobilina (B). Interação 3D AChE e ficocianobilina (C) e IRS-1 e ficocianobilina (D)

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou o potencial neuroprotetor da SPI sobre alterações comportamentais, bioquímicas e imuno-histoquímicas em camundongos submetidos ao modelo DAE induzida por injeções ICV-STZ. Primeiramente, foi possível demonstrar que a administração de STZ induziu neuroinflamação observado pela astrogliose e microgliose, e dano oxidativo, reduziu os níveis de BDNF, aumentou a atividade da AChE, reduziu o número de neurônios e promoveu déficit de aprendizado e de memória. Além disso, o tratamento com SPI protegeu contra a neuroinflamação, estresse oxidativo, reduziu a atividade da AChE, a morte neuronal e contra os déficits de aprendizado e memória.

Pesquisas mostraram que alterações fisiopatológicas induzida por injeções ICV-STZ, são similares às encontradas em pacientes com DA e são tempo-dependentes, com anormalidades comportamentais e bioquímicas identificadas 14 dias após a primeira injeção de STZ (RAVELLI et al., 2017). Embora o STZ reduza a sensibilidade dos receptores de insulina e altere o metabolismo cerebral da glicose, a administração ICV-STZ em dose sub-diabetogênica não afetou os níveis de glicose no sangue periférico, e assim não causou DM, corroborando com dados encontrados em trabalhos anteriores (LEE; LEE, 2017, SAXENA; PATRO; NATH, 2011; SALKOVIC-PETRISIC; HOYER, 2007).

Em relação aos testes comportamentais, primeiramente demonstrou-se que as injeções ICV-STZ não causam alterações locomotoras, observadas no teste do campo aberto. Esses achados estão de acordo com estudos anteriores que utilizaram o mesmo modelo de DAE (SAXENA; PATRO; NATH, 2011; PACHECO et al., 2018). O tratamento com SPI não teve efeito sobre a atividade locomotora dos animais, corroborando com descobertas anteriores (FREITAS et al., 2021).

Além de avaliar a memória de trabalho, o labirinto em Y também é usado para avaliar a memória espacial de curto prazo e a capacidade de aprendizado. Nossos resultados são consistentes com os estudos anteriores, que demonstraram que a administração ICV-STZ reduz o aprendizado, evidenciado pela diminuição na porcentagem de alternâncias espontâneas no labirinto em Y (BALDINOTTI et al., 2022; KAWAMURA et al., 2020; CHEN et al., 2016; KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019; NITSCH; HOYER, 1991; MÜLLER et al., 1998; KAMAT et al., 2015; GRIEB, 2016; LANNERT; HOYER, 1998).

A mudança no metabolismo da glicose no cérebro causado pelo STZ, causa diminuição da produção de acetil coenzima-A (Acetil-CoA), succinil-coenzima A, que, além de ser fonte de energia celular, é matéria-prima utilizada para a produção de ACh (AMENTA; TAYEBATI, 2008). Como resultado, a disfunção energética que ocorre na DA afeta diretamente o sistema colinérgico. Essa pode ser uma das razões pelas quais as pessoas com DA têm déficit de memória e aprendizagem, já que esse sistema neurotransmissor está fortemente ligado aos processos cognitivos.

Ademais, as injeções ICV-STZ prejudicaram a memória de reconhecimento (episódica) recente e tardia, 16 dias após sua administração. Esses resultados são consistentes com relatos prévios da literatura (RAVELLI et al., 2017; BASSANI et al., 2017; GÁSPÁR, A. et al., 2021; ROY et al., 2022). Sabe-se que o hipocampo está ligado tanto à memória espacial quanto ao reconhecimento de objetos de longo prazo, enquanto o córtex perirrinal está mais fortemente ligado ao reconhecimento de objetos de curto prazo (DE JAEGER et al., 2013; WINTERS; SAKSIDA; BUSSEY, 2008).

Em concordância com os dados anteriores, a injeção ICV-STZ induziu déficit na memória espacial observado no teste do labirinto aquático de Morris, corroborando com trabalhos anteriores (HUANG et al., 2018; HUANG et al., 2022; ZHOU et al., 2013; ROY et al., 2022). Por fim, o teste de esquiva passiva, frequentemente usado para avaliar a aprendizagem e a memória aversiva em modelos animais, demonstrou que os animais que receberam ICV-STZ apresentaram déficits memória de curto prazo e de longo prazo. Os resultados do nosso estudo concordam com pesquisas anteriores que mostraram que injeções ICV-STZ causaram déficits na memória aversiva (CHEN, 2016; DARBANDI; RAMEZANI; NOORI, 2018; GÁSPÁR, et al., 2021; ROY et al., 2022).

De forma interessante, os primeiros sinais do comprometimento cognitivo progressivo que afeta pacientes com DA são desorientação espacial e temporal (TU et al., 2015), bem como prejuízos na memória episódica, que integra os componentes “o quê”, “quando” e “onde” de um episódio ou evento (DERE; PAUSE; PIETROWSKY, 2010). Adicionalmente, regiões corticais e hipocampais recebem projeções colinérgicas do septo, estão implicadas na aquisição da memória (DE JAEGER et al., 2013), e acredita-se que a STZ via ICV possa romper essas conexões, causando alterações na consolidação da memória.

Estudos mostraram uma ligação entre a função de memória de longo prazo prejudicada e o acúmulo de placas senis no hipocampo e no córtex entorrinal (REITZ et al., 2009). Como essa área do cérebro é essencial para a formação e manutenção de novas memórias (BEKINSCHTEIN et al., 2008), acredita-se que o acúmulo peptídeo A β contribua para as dificuldades de memória típicas da DA (REITZ et al., 2009). Pesquisas demonstram que injeções ICV-STZ criam um estado de resistência à insulina no cérebro que eventualmente leva ao desenvolvimento de patologia A β e aumento da hiperfosforilação da tau (SHINGO et al., 2012).

Observa-se que o desempenho cognitivo é altamente correlacionado com a densidade de conexões sinápticas, e sua redução progressiva é um correlato estrutural implicado no declínio cognitivo e déficit de aprendizagem em indivíduos com DA precoce (SCHEFF et al., 2006; SCHEFF et al., 2007). De fato, déficits na capacidade de criar e reter novas memórias são as manifestações clínicas mais precoces da DA. Além disso, a DA, também é caracterizada por atrofia neocortical progressiva com perda progressiva de sinapses e neurônios (JAHN, 2013).

Cabe ressaltar que o tratamento com a SPI foi capaz de atenuar os déficits de aprendizado e memória induzidos pela injeção ICV-STZ. Estudos demonstram que compostos polifenólicos e flavonoides são importantes nas dietas porque combatem os radicais livres e reduzem a inflamação (YAHFOUFI et al., 2018; ROMÁN et al., 2019) e são capazes de reduzir a hiperfosforilação de tau e a agregação β -amiloide em modelos animais de DA (ZHENG et al., 2019). Ainda destacamos que a SPI possui vários outros componentes químicos, incluindo ácidos graxos poli-insaturados que são benéficos para a saúde do cérebro (Román et al., 2019). Pesquisas anteriores, demonstraram que uma dieta rica com SPI pode melhorar o aprendizado e a memória em camundongos com neurotoxicidade induzida pelo peptídeo β -amiloide (KOH et al., 2017), bem como aprendizagem espacial e memória em camundongos submetidos ao modelo de amnésia induzido por escopolamina (CHOI; KANG; LEE, 2018).

A SPI protegeu contra déficits de memória recente e tardia induzida por ICV-STZ, o que reforça o potencial neuroprotetor da SPI, já mencionado em estudos anteriores (LIMA et al., 2018; PÉREZ-JUÁREZ et al., 2016). Além do mais, um ensaio clínico randomizado duplo-cego descobriu que a ingestão de 1g/dia de extrato etanólico de SPI por 12 semanas melhorou o desempenho cognitivo de idosos com demência leve a moderada, com melhora significativa no aprendizado visual dos

sujeitos, memória de trabalho visual e aprendizagem verbal, quando avaliado antes e após o uso de SPI comparado ao placebo (CHOI et al., 2022).

O tratamento com SPI também protegeu contra os déficits de memória aversiva recente. Hwang e colaboradores (2011) realizaram o teste de esQUIVA passiva em camundongos com fenótipo de envelhecimento acelerado (SAMP8) e demonstraram que o tratamento com SPI na dose mínima de 50 mg foi eficiente em melhorar a capacidade de consolidação da memória, possivelmente, diminuindo o acúmulo de proteína A β e por redução do dano oxidativo.

Por meio do teste do labirinto em cruz elevado, foi realizada a avaliação de um possível efeito ansiogênico das injeções ICV-STZ, já que 60-90% dos pacientes com DA apresentam alterações neuropsiquiátricas, incluindo alucinações, delírios, agitação/agressão, disforia/depressão, ansiedade, irritabilidade, apatia, atividade motora anormal que são comumente indicações precoces da DA (CUMMINGS et al., 2016; ISMAIL et al., 2018). Os animais submetidos às injeções de ICV-STZ não apresentaram alteração comportamental relacionada à ansiedade. Em consistência com nossos resultados Roy et al. (2022) não encontraram evidências de alterações relacionadas à ansiedade em ratos submetidos ao modelo de DAE induzido por ICV-STZ, eles notaram que um fenótipo ansioso foi observado apenas 60 dias após a injeção inicial de STZ, sugerindo que os sintomas relacionados a ansiedade são dependentes do tempo.

A administração de SPI não teve efeito sobre o comportamento do tipo ansioso, o que está de acordo com os achados de outras pesquisas que constataram que a administração de SPI na dose de 200 mg/Kg não teve efeito sobre o comportamento de animais controle (sem exposição ao estresse de contenção), os pesquisadores só detectaram resposta ansiolítica da SPI quando esses animais foram expostos ao estresse de contenção; isso indica que a SPI tem a capacidade de reduzir a ansiedade, mas apenas quando há estímulos ambientais negativos (MORADI-KOR et al., 2020).

Para investigar os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos da SPI, foram realizados testes para avaliar as defesas antioxidantes, estresse oxidativo, neuroinflamação, neurogênese e atividade da AChE no córtex pré-frontal e hipocampo. Adicionalmente, foi realizada uma investigação de modelagem molecular *in silico* com a ficocianobilina para investigar as possíveis interações químicas com AChE e IRS-1.

Estudos anteriores demonstraram que o estresse oxidativo está presente no cérebro de pessoas com comprometimento cognitivo leve e DA precoce, conforme evidenciado por um aumento nos subprodutos neurotóxicos da peroxidação lipídica, como 4-hidroxinonenal (HNE) e acroleína (WILLIAMS et al., 2006). Em nosso estudo, foi observado que camundongos que receberam injeções ICV-STZ apresentaram níveis aumentados de MDA, Nitrito e ânion superóxido e níveis reduzidos de GSH no córtex pré-frontal e hipocampo. As mudanças observadas nos parâmetros de estresse oxidativo nos camundongos que receberam injeções ICV-STZ, se correlacionaram com relatos anteriores, que utilizaram o mesmo modelo de DAE induzido por ICV-STZ (ISHRAT et al., 2009; JAVED et al., 2011; ZHOU et al., 2013; HUANG et al., 2018; AGRAWAL et al., 2010).

A SPI aumentou os níveis GSH no córtex pré-frontal e hipocampo, da mesma forma reduziu os níveis de TBARS, nitrito e acúmulo de ânion superóxido. A capacidade antioxidante da SPI já foi demonstrada em estudos clínicos e em modelos animais de doenças neurodegenerativas (TROTТА et al., 2022; LIMA et al., 2017; WANG et al. 2020; SINHA et al., 2020; KOH et al., 2017). Esses efeitos se devem à presença de seus constituintes bioativos, principalmente a ficocianina, uma das mais importantes ficobiliproteínas (TROTТА et al., 2022; WU et al., 2016), compostos fenólicos, vitaminas essenciais, minerais e ácidos graxos poli-insaturados, principalmente ômega-6 e ômega-3 (ELFAR et al., 2022).

Foi demonstrado que o extrato proteico da SPI suprime a peroxidação lipídica (TBARS e Nitrito) em animais com DP induzida por 6-OHDA, e esse efeito foi atribuído a presença de altas concentrações de ficocianina (LOPES et al., 2022). Outros componentes bioativos encontrados na espirulina, como carotenoides (HIRA et al., 2019), compostos fenólicos (TAYANLOO-BEIK; KIASALARI; ROGHANI, 2022), flavonoides (AKHTAR et al., 2021; PACHECO et al., 2018), e vitamina E (TIWARI et al., 2009; BORTOLINI et al., 2022), já demonstraram ter efeitos antioxidantes.

Por exemplo, a capacidade dos carotenoides de atuar como antioxidantes está relacionada principalmente à sua estrutura, que é composta por ligações duplas conjugadas que podem funcionar como antioxidantes em organismos vivos possivelmente interagindo efetivamente com íons radicais e ERO (CARDOSO, 1997; CONCEIÇÃO et al., 2017).

Além disso, acredita-se que a ficocianina pode absorver radicais livres e dessa forma causar efeitos protetores. Segundo Vadiraja et al. (2001), esta

ficobiliproteína e seu cromóforo ficocianobilina tem uma capacidade dose-dependente de se ligar ao peroxinitrito e prevenir danos oxidativos ao DNA. Além disso, Estrada e colaboradores (2001) investigaram a atividade antioxidante de várias frações obtidas durante o processo de purificação da ficocianina por meio da atividade de eliminação do radical hidroxila e estabeleceram uma conexão entre o aumento da concentração de ficocianina e o aumento da atividade antioxidante em várias frações do extrato da SPI.

Outro estudo mostrou que fêmeas prenhas submetidas ao estresse por desnutrição proteica a suplementação com SPI melhoraram as habilidades comportamentais e cognitivas de sua prole, diminuindo os níveis de MDA, aumentando a atividade de SOD e CAT, aumentando a espessura do córtex cerebral, melhorando a morfologia neuronal e aumentando a complexidade da árvore dendrítica (SINHA et al., 2020), reforçando o potencial antioxidante da SPI.

Em resposta à neuroinflamação as células gliais respondem a todo tipo de insulto patológico iniciando o complexo programa de ativação, conhecida como gliose reativa, que é uma reação de autodefesa que visa manter a homeostase, eliminar estímulos lesivos e restaurar a integridade tecidual (RODRÍGUEZ-ARELLANO et al., 2016; SOFRONIEW; VINTERS, 2010; PEKNY; WILHELMSSON; PEKNA, 2014). A resposta gliótica resulta na geração de numerosos fenótipos gliais que contribuem para a neuroproteção, vedação física das áreas danificadas ou uma remoção de patógenos através de fagocitose (PEKNY; WILHELMSSON; PEKNA, 2014). No entanto, o processo de neuroinflamação é prejudicial quando se torna crônico. A análise do curso de tempo da neuroinflamação na DA mostra que a presença da microgliose começa em pacientes com comprometimento cognitivo leve e atinge o pico em casos moderadamente afetados (ARENDS et al., 2000).

Nosso estudo mostrou que as injeções ICV-STZ causaram astrogliose e microgliose, no córtex pré-frontal e no hipocampo, assim como demonstrado por estudo anteriores (CHEN et al., 2014; YANG et al., 2020; KRASKA et al., 2012; CHEN et al., 2013; JAVED et al., 2012; LUO et al., 2019; TIWARI et al., 2021).

Astrogliose foi encontrada no parênquima cerebral de camundongos transgênicos APP V717I (Londres) bem antes de qualquer depósito A β detectável, liberando moléculas pró-inflamatórias e elevando a expressão da iNOS, possivelmente preparando o desenvolvimento futuro de placas senis (HENEKA et al., 2005). Por outro lado, um estudo com cultura de células evidenciou que os peptídeos

A β liberados por APPs são ativadores de células gliais (BARGER; HARMON, 1997). A microglia e a astroglia, quando ativadas, liberam citocinas e ERO que podem levar à disfunção e morte neuronal. Além disso, citocinas geradas a partir da glia, como TNF- α e IFN- γ , podem estimular a produção de peptídeos A β (BLASKO et al., 1999), indicando a existência de um sistema de feedback positivo dos processos neuroinflamatórios e formação das placas senis. De fato, várias pesquisas mostraram que a astrogliose e microgliose estão relacionadas à deposição do peptídeo A β e ao acúmulo de emaranhados neurofibrilares ao longo da doença (MINTER; TAYLOR; CRACK, 2016; ALASMARI et al., 2018).

Vale ressaltar, que neuroinflamação induzida pela STZ também pode ser ocasionada pela desregulação da via IRS/PI3K/AKT/GSK-3 β . Estudos associaram o processo de inflamação cerebral a desregulação dessa via (YANG et al., 2020; GERZSON et al., 2020; AGRAWAL et al., 2020; HUANG et al., 2022). Foi demonstrado que um dos principais achados bioquímicos do modelo de DAE induzido por ICV-STZ é a inibição da via de sinalização IRS/PI3K/AKT/, esse processo gera desinibição da regulação da GSK-3 β , resultando em um aumento da sua atividade, o que facilita a acumulação de A β e a hiperfosforilação de Tau (KAMAT et al., 2015).

Nosso trabalho mostrou que o tratamento com SPI atenuou a astrogliose e microgliose no córtex e hipocampo. O efeito neuroprotetor da SPI tem sido relacionado às suas propriedades antioxidantes e capacidade de suprimir a neuroinflamação em modelos animais de doenças neurodegenerativas (LOPES et al., 2022; STRÖMBERG et al., 2005; SINHA et al., 2020). Outras investigações mostraram que o pré e pós-tratamento com um extrato SPI em cultura de células microgliais primárias desafiadas com lipopolissacarídeo reduziu a ativação microglial, a liberação de IL-1 β e TNF- α , e a superexpressão de iNOS (PIOVAN et al., 2021).

Agrawal e colaboradores (2020) investigaram o efeito da ficocianina, um componente do extrato de SPI, no comprometimento cognitivo em ratos submetidos às injeções ICV-STZ. O tratamento com ficocianina diminuiu os níveis TNF- α que subsequentemente estimula a ativação do NF- κ B, elevou os níveis de BDNF e IGF-1, aumentando a regulação positiva do IRS-1. Foi demonstrado que a ficocianina aumenta a afinidade de ligação da insulina ao seu receptor, IRS-1, iniciando assim a via IRS-1/PI3K/Akt, via de sinalização que regula a proliferação celular, diferenciação, metabolismo e reorganização do citoesqueleto, levando à sobrevivência das células e aumento da utilização de glicose. Como resultado, é possível que o SPI tenha

reduzido a resistência à insulina por meio da fosforilação do IRS-1, diminuindo assim o processo neuroinflamatório.

O processo neuroinflamatório causa diminuição da sinalização de BDNF na fenda sináptica, reduzindo a sinalização relacionada à sobrevivência neuronal (LIMA GIACOBBO et al., 2019). Estudos já evidenciaram que a neurogênese pode ser inibida pela micróglia ativada em condições inflamatórias (BUTOVSKY et al., 2006). Citocinas pró-inflamatórias e NO secretados por células imunes influenciam negativamente a neurogênese adulta (RUSSO; BARLATI; BOSETTI, 2011; FUSTER-MATANZO et al., 2013). É crucial enfatizar que o ambiente inflamatório pode afetar o nicho de células-tronco neurais e, como resultado, alterar a capacidade das células-tronco de se autorrenovar, sobreviver, migrar e se diferenciar em novos neurônios (ROZEMULLER; VAN GOOL; EIKELENBOOM, 2005; RUSSO; BARLATI; BOSETTI, 2011; PATTERSON, 2015). De fato, a expressão do BDNF no hipocampo e em algumas regiões corticais, incluindo os córtices temporal e frontal, está significativamente diminuída em pacientes com DA (MURER; YAN; RAISMAN-VOZARI, 2001).

Os resultados do nosso estudo revelaram uma redução no número de neurônios imunorreativos para BDNF no córtex pré-frontal e no hipocampo em animais que receberam a ICV-STZ. Sua redução sugere problemas na manutenção da plasticidade sináptica e na sinaptogênese. Além disso, várias investigações em animais usando o modelo de DAE induzido por injeções de ICV-STZ relataram que os níveis de BDNF diminuíram drasticamente no córtex e no hipocampo (AGRAWAL et al., 2020; LUO et al., 2019; TIWARI et al., 2021), apoiando nossos achados. A diminuição dos níveis da proteína BDNF e mRNA no neocórtex e no hipocampo foi mostrada em pacientes com DA (CONNOR et al., 1997). Além disso, a depleção de BDNF, diminui atividade de CREB e está associada ao acúmulo de A β , hiperfosforilação da Tau, neuroinflamação e apoptose neuronal (TEJEDA; DÍAZ-GUERRA, 2017).

Estudos prévios em animais tratados com ficocianina extraída da SPI, mostrou que os níveis de BDNF no hipocampo aumentaram em animais expostos ao modelo de DAE induzido por STZ, resultando em uma melhora cognitiva considerável (AGRAWAL, et al., 2020). Outro estudo mostrou que a suplementação de SPI reduziu a neurodegeneração neuronal de ratas cronicamente estressadas e aumentou os níveis de BDNF e a remodelação neuroanatômica no hipocampo (MORADI-KOR et

al., 2019). Em nosso estudo, o tratamento com a SPI não foi capaz de aumentar a expressão de BDNF nos animais submetidos as injeções de ICV-STZ.

As disparidades nos resultados podem estar relacionadas ao tempo de tratamento e dose administrada. Agrawal et al. (2020) mostraram que a ficocianina isolada aumentou os níveis de BDNF 29 dias após a injeção inicial de STZ. Em um modelo de DAE causado por injeções ICV do peptídeo β -amiloide, Koh e colaboradores (2017) usaram um protocolo de 46 dias para testar se a *Spirulina maxima* aumentava os níveis de BDNF. Ademais, Moradi-kor et al. (2019) observaram aumento nos níveis de BDNF no córtex pré-frontal de ratas tratados com SPI na dose de 200 mg/kg expostas ao estresse crônico e descobriram um efeito sinérgico nos níveis de BDNF quando a SPI foi combinada com exercício voluntário e o enriquecimento ambiental.

Existem várias etapas envolvidas na síntese e maturação do BDNF maduro, envolvendo a formação de várias isoformas precursoras (KOWIAŃSKI et al., 2018). Como resultado, postulamos que nosso protocolo não durou tempo suficiente para que a SPI aumentasse significativamente a expressão de BDNF, dessa forma pesquisas adicionais são necessárias para entender completamente os mecanismos potenciais pelos quais a SPI poderia estimular a expressão de BDNF.

Ademais, foi possível observar um aumento significativo da atividade da AChE no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos que receberam apenas injeções ICV-STZ. Numerosas investigações demonstraram que a injeção ICV-STZ aumenta a atividade da AChE no córtex e hipocampo, modulando, negativamente, o sistema colinérgico (THOMÉ et al., 2018; CHEN, 2016; PACHECO et al., 2018; AGRAWAL, 2020; AGRAWAL, 2009; AGRAWAL, 2010). Outras investigações verificaram que aferentes colinérgicos estimulam tonicamente a síntese de BDNF no cérebro de ratos e que o aumento atividade da AChE diminui a expressão de BDNF no hipocampo, o que é totalmente consistente com nossos achados, uma vez que a STZ reduziu o número de neurônios imunorreativos para BDNF no córtex cerebral e hipocampo, sugerindo mecanismos interligados e que níveis diminuídos de ACh afetam a memória, o aprendizado e a produção de BDNF (LAPCHAK et al., 1993).

É possível que a atividade da AChE, também, possa modular a ativação da microglia. Esta premissa é apoiada por estudos anteriores que mostram que em culturas de células microgliais a AChE induz alterações na morfologia celular, bem como regulação positiva da iNOS (VON BERNHARDI et al., 2003). Outro estudo

demonstrou que o aumento da atividade da AChE aumentou a ativação microglial e níveis de mRNA para HMGB1, uma citocina que pode ser liberada passivamente de células necróticas ou liberada ativamente de células imunoativadas (WANG et al., 1999; ABRAHAM et al., 2000).

Nosso estudo mostrou que a SPI impediu o aumento da atividade da AChE no córtex pré-frontal, e consequentemente aumentou a ACh na fenda sináptica, levando a uma melhora do aprendizado e da memória. Corroborando os presentes achados, estudos mostraram que a SPI é capaz de inibir a atividade da AChE em estudos *in vitro* e *in vivo* (KOH et al., 2017a; KOH et al., 2017b; AGRAWAL et al., 2020; SUBRAMANIAN; MADHAVADAS, 2015; WANG et al., 2020).

Realizamos um estudo usando modelagem molecular para validar a interação química que a ficocianobilina tem com o sítio ativo da AChE. Os resultados nos permitiram supor que o efeito inibitório sobre a AChE se dá através interações químicas, como ligações covalentes e pontes de hidrogênio entre ligante e alvo. Nosso estudo *in-silico* está de acordo com os dados experimentais *in vivo* aqui obtidos, e em outras publicações (AGRAWAL et al., 2020) que evidenciaram que a ficocianina na dose de 100 mg/Kg inibiu efetivamente a AChE *in vivo*.

Ao se ligar ao sítio ativo da AChE o SPI pode impedir a ligação da ACh ao sítio esterásico e impedir sua degradação, permitindo que a ACh fique mais tempo atuando nas fendas pós-sinápticas. Sublinhamos que o foco primário do tratamento sintomático da demência, na atualidade é o aumento da atividade colinérgica alcançada pela inibição da AChE (SHARMA, 2019; AGO et al., 2011). Nosso estudo *in silico* mostrou que a ficocianina se liga a AChE com uma força de ligação comparável à dos inibidores tradicionais, como a galantamina (SIBANYONI et al., 2020), que é usada na clínica no tratamento da DA.

Foi observada significativa morte celular no córtex pré-frontal e no hipocampo, dos animais que receberam injeções ICV-STZ, mostrando que houve neurodegeneração, assim como demonstrado por Biswas e colaboradores (2018), os quais demonstraram morte celular por apoptose no córtex pré-frontal de animais submetidos ao modelo de DAE induzida por ICV-STZ. Já Zhou et al., (2013) e Huang et al., (2018) observaram morte neural na região do córtex e hipocampo e associaram a morte neuronal a presença do estresse oxidativo e hiperfosforilação da tau. Por outro lado, Gerzson, et al (2020) observou morte neuronal e atribuiu esse efeito a presença da neuroinflamação. Ademais, os níveis reduzidos de BDNF podem contribuir para a

degeneração de populações neuronais específicas e atrofia progressiva de neurônios no cérebro afetado por DA (CONNOR et al., 1997).

Ao reduzir o estresse oxidativo e a neuroinflamação, dois fatores que aceleraram o processo de morte neuronal, a tratamento com SPI protegeu as células neuronais da morte neuronal provocada por injeções de ICV-STZ no córtex pré-frontal e no hipocampo. Vários estudos suportam o potencial neuroprotetor de compostos polifenólicos, e carotenoides presentes no extrato de SPI, atribuindo seus efeitos às suas propriedades antioxidantes e capacidade de suprimir a neuroinflamação (PIOVAN et al., 2021; SEO; FISCHER; EFFERTH, 2018; CHOI et al., 2012).

Nosso laboratório mostrou que a SPI tem efeito neuroprotetor e protege contra déficits cognitivos em modelo de camundongo com DP induzida por 6-OHDA, reduzindo a inflamação e prevenindo o estresse oxidativo (LIMA et al., 2017). Portanto, a SPI demonstrou atividade anti-neuroinflamatória, que em associação com propriedades antioxidantes, pode ser responsável, pelo menos em parte, pela neuroproteção contra a morte celular induzida por STZ e comprometimento da memória.

Agrawal e colaboradores (2020) mostraram que os fatores pró-apoptóticos (BAX e caspase-3) aumentaram, enquanto os fatores anti-apoptóticos (BCL-2) diminuíram, em animais submetidos as injeções de ICV-STZ. No entanto, o tratamento com ficocianina causou uma mudança perceptível nos níveis desses biomarcadores apoptóticos, indicando que os componentes presentes nessa cianobactéria, além de reduzirem a inflamação e estresse oxidativo atuam por vias celulares específicas podendo reduzir a morte neuronal, atenuando o processo de neurodegeneração.

Por fim, em nosso estudo resolvemos verificar se a ficocianina, principal componente proteico da SPI, seria capaz de interagir com IRS-1 através de modelagem molecular *in silico*. Nós observamos que a ficocianina foi capaz de interagir com IRS-1 de forma dinâmica através de fortes interações químicas, reforçando a premissa de que compostos proveniente da SPI, como a ficocianina podem se ligar e estimular o IRS-1, reduzir a resistência à insulina, que por sua vez, modularia positivamente a via IRS-1/PI3K/Akt (SIMON et al., 2018; LEE et al., 2017), desencadeando uma série de eventos que podem culminar com crescimento celular e sobrevivência celular. Portanto, podemos sugerir que a ficocianina é provavelmente a substância química capaz de promover efeitos glicêmicos via estimulação de IRS-1. Nosso estudo *in-silico* concordou os dados experimentais obtidos por Agrawal et al.

(2020) que mostrou que a ficocianina na dose de 100 mg/Kg aumentou a expressão de IRS-1 no hipocampo em um modelo de DAE, induzido por ICV-STZ.

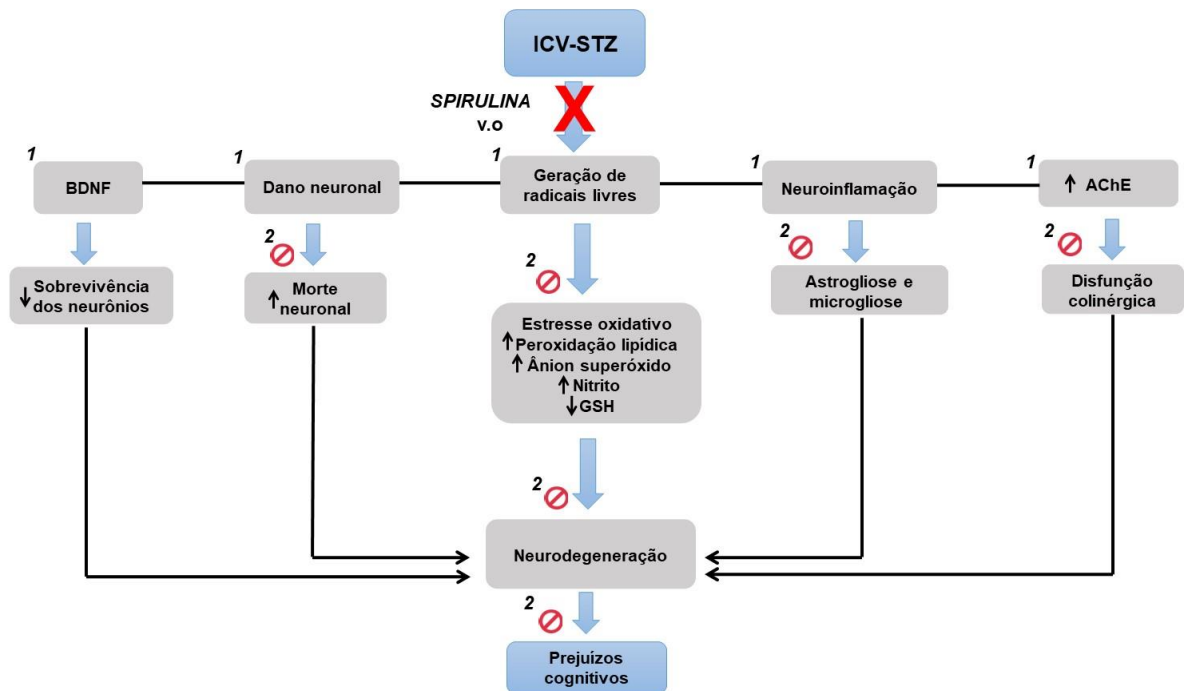
Em resumo, nossos resultados mostraram que as injeções ICV-STZ resultaram em déficits de aprendizado e memória, aumento do estresse oxidativo e diminuição das defesas antioxidantes, aumento da atividade da AChE e desenvolvimento de astrogliose e microgliose, diminuição do BDNF e morte celular. A capacidade neuroprotetora da SPI foi manifestada na atenuação do estresse oxidativo, redução da astrogliose, microgliose, morte celular e fortalecimento das defesas antioxidantes. Como consequência melhorou o aprendizado e a memória. A Figura 43 mostra o resumo esquemático dos resultados do presente estudo.

Conforme mostrado nesse estudo, as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias da SPI certamente contribuíram para suas propriedades neuroprotetoras. O FDA aprovou anteriormente o uso de SPI como nutracêutico, portanto, propomos que usá-la como tratamento adjuvante para DA pode ser uma forma segura de adiar o início da DA ou retardar sua progressão.

Entretanto algumas considerações precisam ser levantadas, em nosso estudo, não tivemos a oportunidade de investigar a via de sinalização IR/IRS/PI3K/Akt/GSK-3 β , nem testamos se houve acumulação do A β e hiperfosforilação de Tau. A coloração com tioflavina S foi empregada por nossa equipe de pesquisa para examinar o desenvolvimento de placas A β no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo DEA induzido por ICV-STZ; no entanto, nenhuma placa A β foi observada, provavelmente devido à menor duração da indução do modelo.

Assim, no futuro, seria interessante verificar as lacunas que precisam ser preenchidas para uma compreensão mais profunda dos benefícios neuroprotetores da SPI e estabelecer os mecanismos de interação específicos entre SPI e receptor de insulina, além de sua atividade antioxidante e anti-inflamatória.

Figura 43. Visão geral dos mecanismos de ação da SPI



1. Mecanismo de ação induzido por ICV-STZ, que resultam em disfunções cognitivas e moleculares
2. Mecanismo de ação pelo qual a *Spirulina* pode melhorar as disfunções cognitivas e moleculares induzidas por ICV-STZ.

⊘ Protegeu

A SPI diminui o estresse oxidativo, a neuroinflamação, a perda e morte neuronal e inibe a atividade da AChE, parâmetros aumentados pela injeção ICV-STZ. Esta neuroproteção culmina na melhora das habilidades cognitivas dos camundongos.

7. CONCLUSÕES

- As injeções ICV de STZ causaram déficits de memória e o tratamento com SPI (50 e 100 mg/Kg) protegeram contra os déficits de memória de trabalho, aversiva e memória episódica, sem afetar a atividade locomotora.
- O tratamento com SPI (100 mg/Kg) diminuiu o estresse oxidativo induzido por STZ, diminuindo a geração de MDA, nitrito e ânion superóxido e aumentando a atividade das defesas antioxidantes GSH, no córtex pré-frontal e hipocampo;
- O tratamento com SPI (100 mg/Kg) inibiu a atividade da AChE melhorando a via colinérgica, no córtex pré-frontal;
- O tratamento com SPI (100 mg/Kg) diminuiu a neuroinflamação induzida por injeções ICV-STZ, diminuindo a astrogliose e microgliose no córtex pré-frontal e hipocampo;
- Em nosso estudo *in sílico* a ficocianobilina, constituinte bioativo da SPI, mostrou interações promissoras com IRS e AChE.

Assim, os resultados mostram que a SPI pode alterar várias vias implicadas na gênese da doença, em fases iniciais, como prevenir a neuroinflamação, estresse oxidativo, melhorar a neurotransmissão colinérgica, além de reduzir os déficits de memória causados pela doença. Os achados sugerem o uso do SPI como possível estratégia terapêutica para atenuar a progressão da DA.

REFERÊNCIAS

- ABDELWAHAB, M. G. et al. Intracranial implantation with subsequent 3D in vivo bioluminescent imaging of murine gliomas. **Journal of Visualized Experiments**, n. 57, 6 nov. 2011..
- ABRAHAM, E. et al. Cutting Edge: HMG-1 as a Mediator of Acute Lung Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 6, p. 2950–2954, 15 set. 2000.
- AGO, Y. et al. Pharmacological Aspects of the Acetylcholinesterase Inhibitor Galantamine. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 116, n. 1, p. 6–17, 2011.
- AGRAWAL, I.; JHA, S. Mitochondrial Dysfunction and Alzheimer's Disease: Role of Microglia. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 12, 20 ago. 2020.
- AGRAWAL, M. et al. Phycocyanin alleviates ICV-STZ induced cognitive and molecular deficits via PI3-Kinase dependent pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 145, p. 111684, nov. 2020.
- AGRAWAL, R. et al. A study of brain insulin receptors, AChE activity and oxidative stress in rat model of ICV STZ induced dementia. **Neuropharmacology**, v. 56, n. 4, p. 779–787, mar. 2009.
- AGRAWAL, R. et al. Effect of curcumin on brain insulin receptors and memory functions in STZ (ICV) induced dementia model of rat. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 3, p. 247–252, mar. 2010.
- AGRAWAL, R. et al. Effect of insulin and melatonin on acetylcholinesterase activity in the brain of amnesic mice. **Behavioural Brain Research**, v. 189, n. 2, p. 381–386, jun. 2008.
- AGUZZI, A.; BARRES, B. A.; BENNETT, M. L. Microglia: Scapegoat, Saboteur, or Something Else? **Science**, v. 339, n. 6116, p. 156–161, 11 jan. 2013.
- AHMAD, M. A. et al. Neuroinflammation: A Potential Risk for Dementia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 2, p. 616, 6 jan. 2022.
- AKHTAR, A. et al. "7,8-Dihydroxyflavone improves cognitive functions in ICV-STZ rat model of sporadic Alzheimer's disease by reversing oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance." **Psychopharmacology** vol. 238,7: 1991-2009, 2021.
- ALASMARI, F. et al. Neuroinflammatory Cytokines Induce Amyloid Beta Neurotoxicity through Modulating Amyloid Precursor Protein Levels/Metabolism. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–8, 25 out. 2018.
- ALFADHLY, N. K. Z. et al. Trends and Technological Advancements in the Possible Food Applications of Spirulina and Their Health Benefits: A Review. **Molecules**, v. 27, n. 17, p. 5584, 30 ago. 2022.

AMENTA, F.; TAYEBATI, S. Pathways of Acetylcholine Synthesis, Transport and Release as Targets for Treatment of Adult-Onset Cognitive Dysfunction. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 488–498, 1 fev. 2008.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5 ed. Washington: American Psychiatric Association, 2013.

AMIDFAR, M. et al. The role of CREB and BDNF in neurobiology and treatment of Alzheimer's disease. **Life Sciences**, v. 257, p. 118020, set. 2020.

ANDERSEN, J. v. et al. Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. **Neuropharmacology**, v. 196, p. 108719, set. 2021.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Outdoor and Indoor Cultivation of *Spirulina platensis* in the Extreme South of Brazil. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 63, n. 1–2, p. 85–90, 1 fev. 2008.

APRAHAMIAN, I.; MARTINELLI, J. E.; YASSUDA, M. S. Alzheimer's disease: an epidemiology and diagnosis review. **Rev. Bras. Clin.Med.**, v. 7, p. 27-35, 2009.

ARENDS, Y. M. et al. Microglia, amyloid and dementia in Alzheimer disease. **Neurobiology of Aging**, v. 21, n. 1, p. 39–47, jan. 2000.

ARNOLD, S. E. et al. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 3, p. 168–181, 29 mar. 2018.

ARVANITAKIS, Z. et al. Diabetes Mellitus and Risk of Alzheimer Disease and Decline in Cognitive Function. **Archives of Neurology**, v. 61, n. 5, p. 661, 1 maio 2004.

AULD, D. S. et al. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to β -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. **Progress in Neurobiology**, v. 68, n. 3, p. 209–245, out. 2002.

AVILA, J. et al. Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 2, p. 361–384, abr. 2004.

BALDINOTTI, R. et al. Protective effects of octylseleno-xylofuranoside in a streptozotocin-induced mouse model of Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 910, p. 174499, nov. 2021

BAMBURG, J. R.; BLOOM, G. S. Cytoskeletal pathologies of Alzheimer disease. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 66, n. 8, p. 635–649, ago. 2009.

BANKS, W. A. The source of cerebral insulin. **European Journal of Pharmacology**, v. 490, n. 1–3, p. 5–12, abr. 2004.

BARCA, G. M. J. et al. Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system. **The Journal of Chemical Physics**, v. 152, n. 15, p. 154102, 21 abr. 2020

BARDAI, F. H.; WANG, L.; MUTREJA, Y.; YENJERLA, M.; GAMBLIN, T. C.; FEANY, M. B. A Conserved Cytoskeletal Signaling Cascade Mediates Neurotoxicity of FTDP-17 Tau Mutations *In Vivo*. **The Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 1, p. 108–119, 3 jan. 2018.

BARGER, S. W.; HARMON, A. D. Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. **Nature**, v. 388, n. 6645, p. 878–881, ago. 1997.

BARTUS, R. T. et al. The Cholinergic Hypothesis of Geriatric Memory Dysfunction. **Science**, v. 217, n. 4558, p. 408–414, 30 jul. 1982.

BASSANI, T. B. et al. Effects of curcumin on short-term spatial and recognition memory, adult neurogenesis and neuroinflammation in a streptozotocin-induced rat model of dementia of Alzheimer's type. **Behavioural Brain Research**, v. 335, p. 41–54, set. 2017

BATEMAN, R. J. et al. Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 3, n. 1, p. 1, 2010

BEAL M. Oxidatively modified proteins in aging and disease. **Free Radic Biol Med**, 32(9): 797–803, 2002.

BEAL, M. F. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. **Annals of Neurology**, v. 58, n. 4, p. 495–505, out. 2005.

BEERI, M. S. et al. Serum concentration of an inflammatory glycotoxin, methylglyoxal, is associated with increased cognitive decline in elderly individuals. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, n. 11–12, p. 583–587, nov. 2011.

BEHL, T. et al. Elucidating the Multi-Targeted Role of Nutraceuticals: A Complementary Therapy to Starve Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, p. 4045, 14 abr. 2021.

BEKINSCHTEIN, P. et al. Reviews: BDNF and Memory Formation and Storage. **The Neuroscientist**, v. 14, n. 2, p. 147–156, 26 abr. 2008.

BEKINSCHTEIN, Pedro et al. "BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage." **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** vol. 105,7, 2711-6. 2008

BENEDICT, C. et al. Intranasal Insulin Improves Memory in Humans: Superiority of Insulin Aspart. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 1, p. 239–243, 16 jan. 2007.

BENEDICT, C. Intranasal insulin improves memory in humans. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29, n. 10, p. 1326–1334, nov. 2004

BERCHTOLD, N. C.; KESSLAK, J. P.; COTMAN, C. W. Hippocampal brain-derived neurotrophic factor gene regulation by exercise and the medial septum. **Journal of Neuroscience Research**, v. 68, n. 5, p. 511–521, 1 jun. 2002.

BERMEJO-BESCÓS, P.; PIÑERO-ESTRADA, E.; VILLAR DEL FRESNO, Á. M. Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 6, p. 1496–1502, set. 2008.

BIOVIA, Dassault Systèmes, BIOVIA Workbook, Release 2020.

BIRD, C. M.; BURGESS, N. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 3, p. 182–194, mar. 2008.

BIRKS, J. S. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. In: BIRKS, J. S. (Ed.). **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2006.

BIRKS, J.; HARVEY, R. J. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 25 jan. 2006.

BISHT, K.; SHARMA, K.; TREMBLAY, M.-È. Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease: Roles of microglia-mediated synaptic remodeling, inflammation, and oxidative stress. **Neurobiology of Stress**, v. 9, p. 9–21, nov. 2018.

BISWAS, J. et al. Involvement of glucose related energy crisis and endoplasmic reticulum stress: Insinuation of streptozotocin induced Alzheimer's like pathology. **Cellular Signalling**, v.42, p. 211–226, jul. 2018.

BLANCO-LUQUIN, I. et al. PLD3 epigenetic changes in the hippocampus of Alzheimer's disease. **Clinical Epigenetics**, v. 10, n. 1, p. 116, 12 dez. 2018

BLANK, M. et al. Basolateral amygdala activity is required for enhancement of memory consolidation produced by histone deacetylase inhibition in the hippocampus. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 111, p. 1–8, maio 2014.

BLASKO, I. et al. TNF α plus IFN γ induce the production of Alzheimer β -amyloid peptides and decrease the secretion of APPs. **The FASEB Journal**, v. 13, n. 1, p. 63–68, jan. 1999.

BLOKLAND, A.; HONIG, W.; RAAIJMAKERS, W. G. M. Effects of intra-hippocampal scopolamine injections in a repeated spatial acquisition task in the rat. **Psychopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 373–376, nov. 1992.

BODEA, L.; ECKERT, A.; ITTNER, L. M.; PIGUET, O.; GÖTZ, J. Tau physiology and pathomechanisms in frontotemporal lobar degeneration. **Journal of Neurochemistry**, v. 138, n. S1, p. 71–94, 15 ago. 2016.

BONDAREFF, W.; MOUNTJOY, C. Q.; ROTH, M. Loss of neurons of origin of the adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus ceruleus) in senile dementia. **Neurology**, v. 32, n. 2, p. 164–164, 1 fev. 1982.

BORTOLINI, D. G. et al. Functional properties of bioactive compounds from *Spirulina* spp.: Current status and future trends. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 5, p. 100134, dez. 2022.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Neurofibrillary changes confined to the entorhinal region and an abundance of cortical amyloid in cases of presenile and senile dementia. **Acta Neuropathologica**, v. 80, n. 5, p. 479–486, set. 1990

BRAAK, H.; BRAAK, E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. **Acta Neuropathologica**, v. 82, n. 4, p. 239–259, set. 1991.

BROADHURST, P. L. DETERMINANTS OF EMOTIONALITY IN RAT. **British Journal of Psychology**, v. 48, n. 1, p. 1–12, fev. 1957.

BUTOVSKY, O. et al. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. **Molecular and cellular neurosciences**, v. 31, n. 1, p. 149–60, jan. 2006

BUTTERFIELD, D. A.; BOYD-KIMBALL, D. Oxidative Stress, Amyloid- β Peptide, and Altered Key Molecular Pathways in the Pathogenesis and Progression of Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 62, n. 3, p. 1345–1367, 13 mar. 2018.

BUTTERFIELD, D. A.; DI DOMENICO, F.; BARONE, E. Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: A key role for oxidative stress in brain. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 9, p. 1693–1706, set. 2014.

BUTTERFIELD, D. A.; HALLIWELL, B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 3, p. 148–160, 8 mar. 2019.

CARDOSO, S. L. Fotofísica de carotenóides e o papel antioxidante de b-caroteno. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 535–540, out. 1997

CARDOSO, S. M.; SANTANA, I.; SWERDLOW, R. H.; OLIVEIRA, C. R. Mitochondria dysfunction of Alzheimer's disease cybrids enhances A β toxicity. **Journal of Neurochemistry**, v. 89, n. 6, p. 1417–1426, 20 jun. 2004.

CARNEY, J. M. Oxidative Stress Leading to Loss of Critical Proteases in Alzheimer's Disease: An Alternative View of the Etiology of AD. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 924, n. 1, p. 160–163, 25 jan. 2006.

CAROLA, V. et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. Carola et al. Behavioural Brain Research, [S.I.], v.134, p. 49–57, 2002.

CARRASQUILLO, M. M. et al. Replication of CLU, CR1, and PICALM Associations With Alzheimer Disease. **Archives of Neurology**, v. 67, n. 8, 1 ago. 2010.

CARRASQUILLO, M. M. et al. Replication of EPHA1 and CD33 associations with late-onset Alzheimer's disease: a multi-centre case-control study. **Molecular Neurodegeneration**, v. 6, n. 1, p. 54, 28 dez. 2011.

CARRERA, I.; MARTÍNEZ, O.; CACABELOS, R. Neuroprotection with Natural Antioxidants and Nutraceuticals in the Context of Brain Cell Degeneration: The Epigenetic Connection. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 32, p. 2999–3011, 8 jan. 2020.

CÉSAR-FREITAS, K. G. et al. Incidence of dementia in a Brazilian population: The Tremembé Epidemiologic Study. **Alzheimer's & Dementia**, v. 18, n. 4, p. 581–590, 2 abr. 2022

CHAPUIS, J. et al. Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology. **Molecular Psychiatry**, v. 18, n. 11, p. 1225–1234, 12 nov. 2013

CHEN, D. Neuroprotective effect of amorphophallus campanulatus in stz induced alzheimer rat model. **Africa Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 4, p. 47–54, 23 jul. 2016.

CHEN, G. et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 38, n. 9, p. 1205–1235, 17 set. 2017.

CHEN, X. et al. Neuroprotective Natural Products for Alzheimer's Disease. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1309, 25 maio 2021.

CHEN, Y. et al. A Non-transgenic Mouse Model (icv-STZ Mouse) of Alzheimer's Disease: Similarities to and Differences from the Transgenic Model (3xTg-AD Mouse). **Molecular Neurobiology**, v. 47, n. 2, p. 711–725, 14 abr. 2013.

CHEN, Y. et al. Intracerebroventricular Streptozotocin Exacerbates Alzheimer-Like Changes of 3xTg-AD Mice. **Molecular Neurobiology**, v. 49, n. 1, p. 547–562, 31 fev. 2014.

CHOI, D.-Y. et al. Obovatol improves cognitive functions in animal models for Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, p. no-no, jan. 2012.

CHOI, W. Y.; KANG, D. H.; LEE, H. Y. Effect of Fermented *Spirulina maxima* Extract on Cognitive-Enhancing Activities in Mice with Scopolamine-Induced Dementia. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 1–9, 26 nov. 2018

CHOI, W.-Y. et al. The Effects of Spirulina maxima Extract on Memory Improvement in Those with Mild Cognitive Impairment: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. **Nutrients**, v. 14, n. 18, p. 3714, 9 set. 2022

CHOURAKI, V.; SESHADRI, S. Genetics of Alzheimer's Disease. *Em: [s.l: s.n.]p.* 245–294, 2014.

COLE, G. M.; FRAUTSCHY, S. A. The role of insulin and neurotrophic factor signaling in brain aging and Alzheimer's Disease. **Experimental Gerontology**, v. 42, n. 1–2, p. 10–21, jan. 2007.

CONCEIÇÃO, K.N. et al. Poder antioxidante de carotenoides, flavonoides e vitamina e na prevenção da arteriosclerose. **Revista Ciência & Saberes-Facema**, v. 2, n. 4, p. 320-324, 2017.

CONNOR, B. et al. Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. **Molecular Brain Research**, v. 49, n. 1–2, p. 71–81, out. 1997.

CONNOR, B. et al. Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. **Molecular Brain Research**, v. 49, n. 1–2, p. 71–81, out. 1997.

CONRAD, C. D. et al. Sex differences in spatial and non-spatial Y-maze performance after chronic stress. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 79, n. 1, p. 32–40, jan. 2003.

CRAFT, S. Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment. **Curr Alzheimer Res.**; 4(2):147–152, 2007.

CRAFT, S. Intranasal Insulin Therapy for Alzheimer Disease and Amnesic Mild Cognitive Impairment. **Archives of Neurology**, v. 69, n. 1, p. 29, 1 jan. 2012.

CRANE, P. K. et al. Glucose Levels and Risk of Dementia. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 6, p. 540–548, 8 ago. 2013.

CREHAN, H. et al. Complement receptor 1 (CR1) and Alzheimer's disease. **Immunobiology**, v. 217, n. 2, p. 244–250, fev. 2012.

CROWTHER, T.; GOEDERT, M.; WISCHIK, C. M. The Repeat Region of Microtubule-Associated Protein Tau Forms Part of the Core of the Paired Helical Filament of Alzheimer's Disease. **Annals of Medicine**, v. 21, n. 2, p. 127–132, 8 jan. 1989.

CRUZ, J. et al. Efeitos da administração crônica de etanol sobre a aprendizagem no reconhecimento de objetos em camundongos nadadores. **Revista Dynamis**, v. 15, p. 26–31, 2009.

CSAJBÓK, É. A.; TAMÁS, G. Cerebral cortex: a target and source of insulin? **Diabetologia**, v. 59, n. 8, p. 1609–1615, 20 ago. 2016.

CUMMINGS, J. et al. Role of Donepezil in the Management of Neuropsychiatric Symptoms in Alzheimer's Disease and Dementia with Lewy Bodies. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 22, n. 3, p. 159–166, mar. 2016.

CZAPSKI, G. A.; STROSZNAJDER, J. B. Glutamate and GABA in Microglia-Neuron Cross-Talk in Alzheimer's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11677, 28 out. 2021.

DADHANIA, P. V. et al. Nutraceuticals against Neurodegeneration: A Mechanistic Insight. **Current Neuropharmacology**, v. 14, n. 6, p. 627–640, 27 jun. 2016.

DANYSZ, W.; ZAJACZKOWSKI, W.; PARSONS, C. G. Modulation of learning processes by ionotropic glutamate receptor ligands. **Behavioural pharmacology**, v. 6, n. 5 And 6, p. 455–474, ago. 1995.

DARBANDI, N.; RAMEZANI, M.; NOORI, M. Mespilus germanica Flavonoids Attenuate Cognitive Dysfunction in the Streptozotocin-induced Rat Model of Alzheimer's Disease. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n. 4, 2018.

DAVIS, K. L.; YAMAMURA, H. I. Cholinergic underactivity in human memory disorders. **Life Sciences**, v. 23, n. 17–18, p. 1729–1733, out. 1978.

DE JAEGER, X. et al. Decreased acetylcholine release delays the consolidation of object recognition memory. **Behavioural Brain Research**, v. 238, p. 62–68, fev. 2013

DE ROSSI, P. et al. Aberrant accrual of BIN1 near Alzheimer's disease amyloid deposits in transgenic models. **Brain Pathology**, v. 29, n. 4, p. 485–501, jul. 2019.

DELANOGARE, E. et al. Hipótese amiloide e o tratamento da doença de Alzheimer: revisão dos estudos clínicos realizados. **VITTALLE - Revista de Ciências da Saúde**, v. 31, n. 1, p. 84–106, 1 ago. 2019.

DEMING, Y. et al. A potential endophenotype for Alzheimer's disease: cerebrospinal fluid clusterin. **Neurobiology of Aging**, v. 37, p. 208.e1-208.e9, jan. 2016.

DENG, Y.-L. et al. The prevalence of CD33 and MS4A6A variant in Chinese Han population with Alzheimer's disease. **Human Genetics**, v. 131, n. 7, p. 1245–1249, 1 jul. 2012.

DENOBLE, V. J. et al. Vinpocetine: Nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits of a step-through passive avoidance response in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 24, n. 4, p. 1123–1128, abr. 1986.

DERE, E.; PAUSE, B. M.; PIETROWSKY, R. Emotion and episodic memory in neuropsychiatric disorders. **Behavioural Brain Research**, v. 215, n. 2, p. 162–171, dez. 2010

DHAPOLA, R. et al. Recent advances in molecular pathways and therapeutic implications targeting neuroinflammation for Alzheimer's disease. **Inflammopharmacology**, v. 29, n. 6, p. 1669–1681, 23 dez. 2021.

DHAPOLA, R. et al. Recent advances in molecular pathways and therapeutic implications targeting neuroinflammation for Alzheimer's disease.

Inflammopharmacology, v. 29, n. 6, p. 1669–1681, 23 dez. 2021.

DHILLON, S. Aducanumab: First Approval. **Drugs**, v. 81, n. 12, p. 1437–1443, 29 ago. 2021.

DING, H. et al. Plants, Plants, and More Plants: Plant-Derived Nutrients and Their Protective Roles in Cognitive Function, Alzheimer's Disease, and Other Dementias.

Medicina, v. 58, n. 8, p. 1025, 30 jul. 2022.

DIVINO DA ROCHA, M. et al. The Role of Natural Products in the Discovery of New Drug Candidates for the Treatment of Neurodegenerative Disorders II: Alzheimers Disease. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 10, n. 2, p. 251–270, 1 mar. 2011.

DIXON, M. AND WEBB, E.C. **Enzymes**. 2nd Edition, Academic Press, New York, 1964.

DONOVAN, N. J. et al. Association of Higher Cortical Amyloid Burden With Loneliness in Cognitively Normal Older Adults. **JAMA Psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 1230, 1 dez. 2016.

DORN, A. et al. Insulin-like immunoreactivity in the human brain. **Histochemistry**, v. 74, n. 2, p. 293–300, 1982.

DOWD, J. E.; RIGGS, D. S. A Comparison of Estimates of Michaelis-Menten Kinetic Constants from Various Linear Transformations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 240, n. 2, p. 863–869, fev. 1965.

DRINGEN, R.; GUTTERER, J. M.; HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in brain. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 16, p. 4912–4916, ago. 2000.

DU, H. et al. Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 43, p. 18670–18675, 26 out. 2010.

DUARA, R. et al. Medial temporal lobe atrophy on MRI scans and the diagnosis of Alzheimer disease. **Neurology**, v. 71, n. 24, p. 1986–1992, 9 dez. 2008.

DUDAI, Y. The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? *Annual Review of Psychology*, 55(1), 51–86, 2004.

DUDAI, Y.; MORRIS, R. G. M. Memorable Trends. **Neuron**, v. 80, n. 3, p. 742–750, out. 2013.

DUELLI, R. et al. Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 12, n. 8, p. 737–743, dez. 1994

DUELLI, R.; SCHRÖCK, H.; KUSCHINSKY, W.; HOYER, S. Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 12, n. 8, p. 737–743, dez. 1994.

EASTON, A.; DOUCHAMPS, V.; EACOTT, M.; LEVER, C. A specific role for septohippocampal acetylcholine in memory? **Neuropsychologia**, v. 50, n. 13, p. 3156–3168, nov. 2012.

ECYCLE. Spirulina: o que é e para que serve. 2019. Disponível em <<https://www.ecycle.com.br/spirulina/>>. Acesso em: 02 de jan. de 2023.

EILEEN DOLAN, M. Inhibition of DNA repair as a means of increasing the antitumor activity of DNA reactive agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 26, n. 2–3, p. 105–118, jul. 1997.

EL BAKY, H. H. A.; EL BAROTY, G. S.; MOSTAFA, E. M. Optimization Growth of Spirulina (Arthrospira) Platensis in Photobioreactor Under Varied Nitrogen Concentration for Maximized Biomass, Carotenoids and Lipid Contents. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v. 11, n. 1, p. 40–48, 29 abr. 2020.

ELFAR, O. A. et al. Advances in delivery methods of *Arthrospira platensis* (spirulina) for enhanced therapeutic outcomes. **Bioengineered**, v. 13, n. 6, p. 14681–14718, 1 jun. 2022.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, jul. 1961.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, p. 47–59, nov. 1988.

FAIYAZ et al. Nanomaterials in Alzheimer's disease treatment: a comprehensive review. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 26, n. 10, p. 851, 2021.

FALCO, A. de et al. ALZHEIMER'S DISEASE: ETIOLOGICAL HYPOTHESES AND TREATMENT PERSPECTIVES. **Química Nova**, 2015.

FARMER, J. et al. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male sprague-dawley rats in vivo. **Neuroscience**, v. 124, n. 1, p. 71–79, jan. 2004.

FARRELL, K. et al. Genome-wide association study and functional validation implicates JADE1 in tauopathy. **Acta Neuropathologica**, v. 143, n. 1, p. 33–53, 1 jan. 2022.

FARRIS, WESLEY et al. "Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in

vivo.” **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** vol. 100,7, 2003.

FERNANDEZ, M. A. et al. Transmembrane Substrate Determinants for γ -Secretase Processing of APP CTF β . **Biochemistry**, v. 55, n. 40, p. 5675–5688, 11 out. 2016.

FERNÁNDEZ-ROJAS et al., 2014. Nutraceutical properties of phycocyanin. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 375–392, nov. 2014.

FERNÁNDEZ-ROJAS, B.; HERNÁNDEZ-JUÁREZ, J.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Nutraceutical Properties of Phycocyanin. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 375–392, nov. 2014.

FERREIRA, M. C. et al. Redução da mobilidade funcional e da capacidade cognitiva no diabetes melito tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 9, p. 946–952, dez. 2014.

FERREIRA-VIEIRA, T. et al. Alzheimer’s disease: Targeting the Cholinergic System. **Current Neuropharmacology**, v. 14, n. 1, p. 101–115, 22 jan. 2016.

FIRDAUS, Z.; SINGH, T. D. An Insight in Pathophysiological Mechanism of Alzheimer’s Disease and its Management Using Plant Natural Products. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 35–57, 29 jan. 2021.

FORLENZA, O. v. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 32, n. 3, p. 137–148, jun. 2005.

FOSTER, E. M. et al. Clusterin in Alzheimer’s Disease: Mechanisms, Genetics, and Lessons From Other Pathologies. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, 28 fev. 2019.

FOTUHI, S. N. et al. Memory-related process in physiological status and alzheimer’s disease. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 6, p. 4651–4657, 11 jun. 2020.

FOX, N. C.; COUSENS, S.; SCAHILL, R.; HARVEY, R. J.; ROSSOR, M. N. Using Serial Registered Brain Magnetic Resonance Imaging to Measure Disease Progression in Alzheimer Disease. **Archives of Neurology**, v. 57, n. 3, p. 339, 1 mar. 2000.

FOX, N. C.; FREEBOROUGH, P. A.; ROSSOR, M. N. Visualisation and quantification of rates of atrophy in Alzheimer’s disease. **The Lancet**, v. 348, n. 9020, p. 94–97, jul. 1996.

FREITAS, M. A. et al. Involvement of Opioid System and TRPM8/TRPA1 Channels in the Antinociceptive Effect of *Spirulina platensis*. **Biomolecules**, v. 11, n. 4, p. 592, 17 abr. 2021.

FRIDMAN, C. et al. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 31, n. 1, p. 19–25, 2004.

FUSTER-MATANZO, A. et al. Role of Neuroinflammation in Adult Neurogenesis and Alzheimer Disease: Therapeutic Approaches. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1–9, 2013

GAO, L. et al. Brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer's disease and its pharmaceutical potential. **Translational Neurodegeneration**, v. 11, n. 1, p. 4, 28 jan. 2022.

GAO, P. et al. The Mechanistic Role of Bridging Integrator 1 (BIN1) in Alzheimer's Disease. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 41, n. 7, p. 1431–1440, 27 out. 2021

GÁSPÁR, A. et al. Intracerebroventricularly Injected Streptozotocin Exerts Subtle Effects on the Cognitive Performance of Long-Evans Rats. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 7 maio 2021.

GELLA, A.; DURANY, N. Oxidative stress in Alzheimer disease. **Cell Adhesion & Migration**, v. 3, n. 1, p. 88–93, 5 jan. 2009.

GEMELLI et al. Estresse Oxidativo como Fator Importante na Fisiopatologia da Doença de Alzheimer. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 16, n. 1, p. 67, 10 jan. 2013.

GERZSON, M. F. B. et al. Tannic Acid Ameliorates STZ-Induced Alzheimer's Disease-Like Impairment of Memory, Neuroinflammation, Neuronal Death and Modulates Akt Expression. **Neurotoxicity Research**, v. 37, n. 4, p. 1009–1017, 29 abr. 2020.

GILMOR, M. L. et al. Preservation of nucleus basalis neurons containing choline acetyltransferase and the vesicular acetylcholine transporter in the elderly with mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. **The Journal of comparative neurology**, v. 411, n. 4, p. 693–704, 6 set. 1999.

GLENNER, G. G.; WONG, C. W. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 120, n. 3, p. 885–890, maio 1984.

GO, M. et al. Microglial response to LPS increases in wild-type mice during aging but diminishes in an Alzheimer's mouse model: Implication of TLR4 signaling in disease progression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 479, n. 2, p. 331–337, out. 2016.

GOOSENS, K. A. Hippocampal regulation of aversive memories. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 21, n. 3, p. 460–466, jun. 2011.

GOYAL, S. N. et al. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes – A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. **Chemico-Biological Interactions**, v. 244, p. 49–63, jan. 2016.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, out. 1982.

GREENAMYRE, J. T. et al. Glutamate transmission and toxicity in alzheimer's disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 12, n. 4, p. 421-IN4, jan. 1988.

GREENAMYRE, J. T.; YOUNG, A. B. Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 10, n. 5, p. 593–602, set. 1989.

GREGORY, J.; GAGE, D.; KIPKE, R.; SHAIN, W. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodent, *J Vis Exp*, [S.I.], v.65, p. 1-9, 2012.

GRICIUC, A. et al. Alzheimer's Disease Risk Gene CD33 Inhibits Microglial Uptake of Amyloid Beta. **Neuron**, v. 78, n. 4, p. 631–643, maio 2013.

GRICIUC, A. et al. Gene therapy for Alzheimer's disease targeting CD33 reduces amyloid beta accumulation and neuroinflammation. **Human Molecular Genetics**, v. 29, n. 17, p. 2920–2935, 10 out. 2020.

GRIEB, P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 3, p. 1741–1752, 7 abr. 2016.

GU, H. et al. Association of Clusterin Gene Polymorphisms with Late-Onset Alzheimer's Disease. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 32, n. 3, p. 198–201, 2011.

GUGLIELMOTTO, M. et al. AGEs/RAGE complex upregulates BACE1 via NF-κB pathway activation. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 1, p. 196.e13-196.e27, jan. 2012.

GUO, Y. et al. Functions of amyloid precursor protein in metabolic diseases. **Metabolism**, v. 115, p. 154454, fev. 2021.

GUTIÉRREZ-SALMEÁN, G.; FABILA-CASTILLO, L.; CHAMORRO-CEVALLOS, G. Nutritional and toxicological aspects of spirulina (ARTHROSPIRA). **Nutricion hospitalaria**, v. 32, n. 1, p. 34–40, 1 jul. 2015

H. FERREIRA-VIEIRA, T. et al. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. **Current Neuropharmacology**, v. 14, n. 1, p. 101–115, 22 jan. 2016.

HAAM, J.; YAKEL, J. L. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. **Journal of Neurochemistry**, v. 142, p. 111–121, ago. 2017.

HAINMUELLER, T.; BARTOS, M. Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 21, n. 3, p. 153–168, 10 mar. 2020.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, n. 3, p. 385–403, dez. 1934.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1634–1658, jun. 2006.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312–322, 1 jun. 2006.

HAMPEL, H. et al. A Path Toward Precision Medicine for Neuroinflammatory Mechanisms in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 31 mar. 2020.

HAN, S. et al. Alternative Splicing Regulation of Low-Frequency Genetic Variants in Exon 2 of TREM2 in Alzheimer's Disease by Splicing-Based Aggregation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 9865, 13 set. 2021.

HAN, S. et al. Mitophagy regulates integrity of mitochondria at synapses and is critical for synaptic maintenance. **EMBO reports**, v. 21, n. 9, 3 set. 2020.

HANSEEUW, B. J. et al. Correction: Association of anxiety with subcortical amyloidosis in cognitively normal older adults. **Molecular Psychiatry**, v. 25, n. 10, p. 2644–2644, 11 out. 2020.

HANWELL, M. D. et al. "Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform" **Journal of Cheminformatics**, 4:17. 2012

HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. **Science**, v. 256, n. 5054, p. 184–185, 10 abr. 1992.

HASSAN, AHMED et al. "Regulation of microglial transcription factor MEF2C by Alzheimer's disease-relevant stimuli." **Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association** vol. 17 Suppl 3 (2021).

HATAMI, E. et al. The effect of spirulina on type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 20, n. 1, p. 883–892, 2 jun. 2021

HATAMI, E. et al. The effect of spirulina on type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 20, n. 1, p. 883–892, 2 jun. 2021.

HENEKA, M. T. et al. Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 2, n. 1, p. 22, 7 dez. 2005.

HENSLEY, K. et al. Brain Regional Correspondence Between Alzheimer's Disease Histopathology and Biomarkers of Protein Oxidation. **Journal of Neurochemistry**, v. 65, n. 5, p. 2146–2156, 23 nov. 2002.

HEO, H. J.; LEE, C. Y. Strawberry and Its Anthocyanins Reduce Oxidative Stress-Induced Apoptosis in PC12 Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1984–1989, 1 mar. 2005.

HERNANDO-REQUEJO, V. Nutrición y deterioro cognitivo. **Nutrición Hospitalaria**, 12 jul. 2016.

HIPPIUS H, NEUNDÖRFER G. The discovery of Alzheimer's disease. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 5, n. 1, p.101-108, 2003.

HIRA, S. et al. "β-Carotene: A Natural Compound Improves Cognitive Impairment and Oxidative Stress in a Mouse Model of Streptozotocin-Induced Alzheimer's Disease." **Biomolecules** vol. 9,9 441. 2 Sep. 2019.

HIRA, S. et al. β-Carotene: A Natural Compound Improves Cognitive Impairment and Oxidative Stress in a Mouse Model of Streptozotocin-Induced Alzheimer's Disease. **Biomolecules**, v. 9, n. 9, p. 441, 2 set. 2019.

HOCK, C. et al. Region-Specific Neurotrophin Imbalances in Alzheimer Disease. **Archives of Neurology**, v. 57, n. 6, p. 846, 1 jun. 2000.

HOLLER, C. J. et al. Bridging Integrator 1 (BIN1) Protein Expression Increases in the Alzheimer's Disease Brain and Correlates with Neurofibrillary Tangle Pathology. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 42, n. 4, p. 1221–1227, 10 out. 2014

HOWARTH, C.; GLEESON, P.; ATTWELL, D. Updated Energy Budgets for Neural Computation in the Neocortex and Cerebellum. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 32, n. 7, p. 1222–1232, 21 jul. 2012.

HOWES, M.-J. R.; PERRY, E. The Role of Phytochemicals in the Treatment and Prevention of Dementia. **Drugs & Aging**, v. 28, n. 6, p. 439–468, jun. 2011.

HOYER, S. Brain glucose and energy metabolism abnormalities in sporadic Alzheimer disease. Causes and consequences: an update. **Experimental Gerontology**, v. 35, n. 9–10, p. 1363–1372, dez. 2000.

HOYER, S. Brain glucose and energy metabolism during normal aging. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 2, n. 3, p. 245–258, 1 set. 1990.

HOYER, S. Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. **Journal of Neural Transmission**, v. 105, n. 4, p. 415, 1998.

HOYER, S.; MÜLLER, D.; PLASCHKE, K. Desensitization of brain insulin receptor Effect on glucose/energy and related metabolism. Em: **Cell and Animal Models in Aging and Dementia Research**. Vienna: Springer Vienna, 1994. p. 259–268.

HSU, D.; MARSHALL, G. A. Primary and Secondary Prevention Trials in Alzheimer Disease: Looking Back, Moving Forward. **Current Alzheimer Research**, v. 14, n. 4, p. 426–440, 16 fev. 2017.

HSU, D.; MARSHALL, G. A. Primary and Secondary Prevention Trials in Alzheimer Disease: Looking Back, Moving Forward. **Current Alzheimer Research**, v. 14, n. 4, p. 426–440, 16 fev. 2017.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. N EUROTROPHINS: Roles in Neuronal Development and Function *. p. 677–736, 2001.

HUANG, J. et al. Shen Qi Wan Ameliorates Learning and Memory Impairment Induced by STZ in AD Rats through PI3K/AKT Pathway. **Brain Sciences**, v. 12, n. 6, p. 758, 9 jun. 2022.

HUANG, W.-J.; ZHANG, X.; CHEN, W.-W. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. **Biomedical Reports**, v. 4, n. 5, p. 519–522, maio 2016.

HUANG, X.-B. et al. Neuroprotective effects of tenuigenin on neurobehavior, oxidative stress, and tau hyperphosphorylation induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. **Brain Circulation**, v. 4, n. 1, p. 24, 2018.

HUANG, Y.; MUCKE, L. Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1204–1222, mar. 2012.

HUNSAKER, M. R.; ROGERS, J. L.; KESNER, R. P. Behavioral characterization of a transection of dorsal CA3 subcortical efferents: Comparison with scopolamine and physostigmine infusions into dorsal CA3. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 88, n. 1, p. 127–136, jul. 2007

HWANG, J.-H. et al. Spirulina Prevents Memory Dysfunction, Reduces Oxidative Stress Damage and Augments Antioxidant Activity in Senescence-Accelerated Mice. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 57, n. 2, p. 186–191, 2011.

HYMAN, B. T. et al. Alzheimer's Disease: Cell-Specific Pathology Isolates the Hippocampal Formation. **Science**, v. 225, n. 4667, p. 1168–1170, 14 set. 1984.

ILIEVA, K. et al. Antidepressant agomelatine attenuates behavioral deficits and concomitant pathology observed in streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease in male rats. **Hormones and Behavior**, v. 107, p. 11–19, jan. 2019.

ISHRAT, T. et al. Selenium prevents cognitive decline and oxidative damage in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. **Brain Research**, v. 1281, p. 117–127, jul. 2009.

ISMAIL, Z. et al. Affective and emotional dysregulation as pre-dementia risk markers: exploring the mild behavioral impairment symptoms of depression, anxiety, irritability, and euphoria. **International Psychogeriatrics**, v. 30, n. 2, p. 185–196, 13 fev. 2018.

ISOMAE, K. et al. Effects of T-82, a New Quinoline Derivative, on Cholinesterase Activity and Extracellular Acetylcholine Concentration in Rat Brain. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 88, n. 2, p. 206–212, 2002.

IZQUIERDO, I.; DIAS, R. D. Effect of ACTH, epinephrine, β -endorphin, naloxone, and of the combination of naloxone or β -endorphin with ACTH or epinephrine on memory consolidation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 8, n. 1, p. 81–87, jan. 1983.

IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J. L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behavioral Pharmacology**, v. 11, n. 7, p. 517–534, nov. 2000.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. GABAA receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 12, p. 260–265, jan. 1991.

JAHN, H. Memory loss in Alzheimer's disease. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 445–454, 31 dez. 2013.

JANN, M. W. Rivastigmine, a New-Generation Cholinesterase Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease. **Pharmacotherapy**, v. 20, n. 1, p. 1–12, jan. 2000.

JANSON, J. et al. Increased Risk of Type 2 Diabetes in Alzheimer Disease. **Diabetes**, v. 53, n. 2, p. 474–481, 1 fev. 2004.

JANSON, J. et al. Increased Risk of Type 2 Diabetes in Alzheimer Disease. **Diabetes**, v. 53, n. 2, p. 474–481, 1 fev. 2004.

JAVED, H. et al. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. **Neuroscience**, v. 210, p. 340–352, maio 2012.

JAVED, H. et al. S-allyl cysteine attenuates oxidative stress associated cognitive impairment and neurodegeneration in mouse model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. **Brain Research**, v. 1389, p. 133–142, maio 2011.

JELLINGER, K. A. Alzheimer's Disease. **Neurobiology of Disease**, p. 69–82, 2007.

JELLINGER, K. A. Alzheimer 100 – highlights in the history of Alzheimer research. **Journal of Neural Transmission**, v. 113, n. 11, p. 1603–1623, 9 nov. 2006.

JEON, Y. K.; HA, C. H. The effect of exercise intensity on brain derived neurotrophic factor and memory in adolescents. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 22, n. 1, p. 27, 4 dez. 2017.

JIANG, T. et al. CD33 in Alzheimer's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 49, n. 1, p. 529–535, 28 fev. 2014.

JIN, J.-J. et al. Toll-like receptor 4-dependent upregulation of cytokines in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, n. 1, p. 23, 29 dez. 2008.

JOHN, A.; REDDY, P. H. Synaptic basis of Alzheimer's disease: Focus on synaptic amyloid beta, P-tau and mitochondria. **Ageing Research Reviews**, v. 65, p. 101208, jan. 2021.

JOHNSON, K. A. et al. Brain Imaging in Alzheimer Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 4, p. a006213–a006213, 1 abr. 2012.

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9–10, p. 1865–1879, set. 2006.

JONES, K. Insulin coma therapy in schizophrenia. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 93, n. 3, p. 147–149, 15 mar. 2000.

JONH, L. Mais energia e imunidade com a espirulina brasileira. Conexão Planeta: inspiração para ação. 2016. Disponível em <<https://conexaoplaneta.com.br/blog/mais-energia-e-imunidade-com-a-espirulina-brasileira/#fechar>>. Acesso em: 02 de jan. de 2023.

KAASINEN, V. et al. Regional Effects of Donepezil and Rivastigmine on Cortical Acetylcholinesterase Activity in Alzheimer's Disease. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 22, n. 6, p. 615–620, dez. 2002.

KABIR, MD. T. et al. Therapeutic promise of carotenoids as antioxidants and anti-inflammatory agents in neurodegenerative disorders. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 146, p. 112610, fev. 2022.

KAMAT, P. K. et al. Streptozotocin Intracerebroventricular-Induced Neurotoxicity and Brain Insulin Resistance: a Therapeutic Intervention for Treatment of Sporadic Alzheimer's Disease (sAD)-Like Pathology. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 7, p. 4548–4562, 23 set. 2016.

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

KANG, J. et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. **Nature**, v. 325, n. 6106, p. 733–736, fev. 1987.

KANG, S. et al. Agmatine ameliorates type 2 diabetes induced-Alzheimer's disease-like alterations in high-fat diet-fed mice via reactivation of blunted insulin signalling. **Neuropharmacology**, v. 113, p. 467–479, fev. 2017.

KANG, S.; LEE, Y.; LEE, J. E. Metabolism-Centric Overview of the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Yonsei Medical Journal**, v. 58, n. 3, p. 479, 2017.

KARCH, C. M.; GOATE, A. M. Alzheimer's Disease Risk Genes and Mechanisms of Disease Pathogenesis. **Biological Psychiatry**, v. 77, n. 1, p. 43–51, jan. 2015.

KAWAMURA, N. et al. Reduced brain fractalkine-CX3CR1 signaling is involved in the impaired cognition of streptozotocin-treated mice. **IBRO Reports**, v. 9, p. 233–240, dez. 2020.

KELLAR, D.; CRAFT, S. Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and related disorders: mechanisms and therapeutic approaches. **The Lancet Neurology**, v. 19, n. 9, p. 758–766, set. 2020.

KIM, D.; TSAI, L.-H. Bridging Physiology and Pathology in AD. **Cell**, v. 137, n. 6, p. 997–1000, jun. 2009.

KIM, J. S.; LEVIN, E. D. Nicotinic, muscarinic and dopaminergic actions in the ventral hippocampus and the nucleus accumbens: effects on spatial working memory in rats. **Brain Research**, v. 725, n. 2, p. 231–240, jul. 1996.

KIM, T.-S. et al. Decreased plasma antioxidants in patients with Alzheimer's disease. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 21, n. 4, p. 344–348, abr. 2006.

KISHI, T. et al. Memantine for Alzheimer's Disease: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 60, n. 2, p. 401–425, 18 set. 2017.

KNOPMAN, D. S.; JONES, D. T.; GREICIUS, M. D. Failure to demonstrate efficacy of aducanumab: An analysis of the EMERGE and ENGAGE trials as reported by Biogen, December 2019. **Alzheimer's & Dementia**, v. 17, n. 4, p. 696–701, abr. 2021.

KNUPP, A. et al. Depletion of the AD Risk Gene SORL1 Selectively Impairs Neuronal Endosomal Traffic Independent of Amyloidogenic APP Processing. **Cell Reports**, v. 31, n. 9, p. 107719, jun. 2020.

KOFFIE, R. M.; HYMAN, B. T.; SPIRES-JONES, T. L. Alzheimer's disease: synapses gone cold. **Molecular Neurodegeneration**, v. 6, n. 1, p. 63, 26 dez. 2011.

KOH, E.-J. et al. Spirulina maxima Extract Ameliorates Learning and Memory Impairments via Inhibiting GSK-3 β Phosphorylation Induced by Intracerebroventricular Injection of Amyloid- β 1–42 in Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. 2401, 13 nov. 2017b

KOH, E.-J. et al. Spirulina maxima Extract Prevents Neurotoxicity via Promoting Activation of BDNF/CREB Signaling Pathways in Neuronal Cells and Mice. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1363, 17 ago. 2017a.

KONDAK, C. et al. Hydromethylthionine enhancement of central cholinergic signalling is blocked by rivastigmine and memantine. **Journal of Neurochemistry**, v. 160, n. 2, p. 172–184, 1 jan. 2022. Acesso em: 19 fev. 2022.

KONRAD, R. J. et al. The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic β -cell O-GlcNAc-selective N-acetyl- β -d-glucosaminidase. **Biochemical Journal**, v. 356, n. 1, p. 31–41, 15 maio 2001.

KOWIAŃSKI, P. et al. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 38, n. 3, p. 579–593, 16 abr. 2018.

KRAEUTER, A.-K.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. *Em: [s.l: s.n.]*. p. 105–111.

KRASKA, A. et al. In Vivo Cross-sectional Characterization of Cerebral Alterations Induced by Intracerebroventricular Administration of Streptozotocin. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e46196, 25 set. 2012.

KUTIKHIN, A. G.; YUZHALLIN, A. E.; PONASENKO, A. V. HOW TO ANALYZE AND PRESENT GENETIC EPIDEMIOLOGY DATA IN CANDIDATE STUDIES. **Fundamental and Clinical Medicine**, v. 2, n. 2, p. 77–82, 2017.

LAKHMAN, S. S.; KAUR, G. Effect of alloxan-induced diabetes on acetylcholinesterase activity from discrete areas of rat brain. **Neurochemistry International**, v. 24, n. 2, p. 159–163, fev. 1994.

LALONDE, R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 1, p. 91–104, jan. 2002.

LANE, C. A.; HARDY, J.; SCHOTT, J. M. Alzheimer's disease. **European Journal of Neurology**, v. 25, n. 1, p. 59–70, jan. 2018.

LANNERT, H.; HOYER, S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 112, n. 5, p. 1199–1208, 1998.

LAPCHAK, P. A.; ARAUJO, D. M.; HEFTI, F. Cholinergic regulation of hippocampal brain-derived neurotrophic factor mRNA expression: Evidence from lesion and chronic cholinergic drug treatment studies. **Neuroscience**, v. 52, n. 3, p. 575–585, fev. 1993

LAZAREWICZ, J. W.; WROBLEWSKI, J. T.; SALINSKA, E. NMDA Receptor-Mediated Arachidonic Acid Release In Neurons: Role In Signal Transduction and Pathological Aspects. In: [s.l: s.n.]p. 73–89.

LAZAROV, O.; HOLLANDS, C. Hippocampal neurogenesis: Learning to remember. **Progress in Neurobiology**, v. 138–140, p. 1–18, mar. 2016.

LEAL, G.; COMPRIDO, D.; DUARTE, C. B. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 639–656, jan. 2014.

LEE, J. et al. Spirulina Extract Enhanced a Protective Effect in Type 1 Diabetes by Anti-Apoptosis and Anti-ROS Production. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p. 1363, 15 dez. 2017

LEE, J. W. et al. Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, n. 1, p. 37, 29 dez. 2008.

LENT, R. Pessoas com História: As Bases Neurais da Memória e da Aprendizagem. Em: LENT, R. (ed). Cem Bilhões de Neurônios. Editora Atheneu, São Paulo, pp. 587- 618, 200.

LESTER-COLL, N. et al. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: Relevance to sporadic Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 9, n. 1, p. 13–33, 6 abr. 2006

LEWIS, J. E. et al. The effects of twenty-one nutrients and phytonutrients on cognitive function: A narrative review. **Journal of clinical and translational research**, v. 7, n. 4, p. 575–620, 26 ago. 2021.

LI, Y. The Bioactivities of Phycocyanobilin from *Spirulina*. **Journal of Immunology Research**, v. 2022, p. 1–8, 11 jun. 2022.

LIKHTIK, E.; JOHANSEN, J. P. Neuromodulation in circuits of aversive emotional learning. **Nature Neuroscience**, v. 22, n. 10, p. 1586–1597, 24 out. 2019.

LIMA GIACOBBO, B. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 5, p. 3295–3312, 17 maio 2019.

LIMA, F. A. V. et al. Neuroprotective Activities of *Spirulina platensis* in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease Are Related to Its Anti-Inflammatory Effects. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 12, p. 3390–3400, 31 dez. 2017.

LIN, PETER BOR-CHIAN et al. "INPP5D as a potential therapeutic target against Alzheimer's disease." **Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association**, vol. 17 Suppl 3, 2021.

LIU, C.; YU, J. Genome-Wide Association Studies for Cerebrospinal Fluid Soluble TREM2 in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 11, 25 out. 2019.

LOPES, M. J. P. et al. The Protein-Rich Fraction from *Spirulina platensis* Exerts Neuroprotection in Hemiparkinsonian Rats by Decreasing Brain Inflammatory-Related Enzymes and Glial Fibrillary Acidic Protein Expressions. **Journal of Medicinal Food**, v. 25, n. 7, p. 695–709, 1 jul. 2022.

LÓPEZ-ROMERO, D. et al. Evidence of Some Natural Products with Antigenotoxic Effects. Part 2: Plants, Vegetables, and Natural Resin. **Nutrients**, v. 10, n. 12, p. 1954, 10 dez. 2018.

LOVELL, M. A. et al. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 45, n. 8, p. 1594–1601, 1 ago. 1995.

LU, B.; NAGAPPAN, G.; LU, Y. BDNF and Synaptic Plasticity, Cognitive Function, and Dysfunction. Em: [s.l: s.n.]. p. 223–250.

LU, L. et al. Explore the role of CR1 genetic variants in late-onset Alzheimer's disease susceptibility. **Psychiatric Genetics**, v. 31, n. 6, p. 216–229, 3 dez. 2021.

LU, Y. et al. Cerebral Glucose Metabolism Assessment in Rat Models of Alzheimer's Disease. **American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias**, v. 31, n. 4, p. 333–340, 1 jun. 2016.

LUEPTOW, L. M. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 126, 30 ago. 2017.

LUO, H. et al. Apelin-13 Suppresses Neuroinflammation Against Cognitive Deficit in a Streptozotocin-Induced Rat Model of Alzheimer's Disease Through Activation of BDNF-TrkB Signaling Pathway. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 16 abr. 2019.

LUO, Y.-C.; JING, P. Molecular Interaction of Protein-Pigment C-Phycocyanin with Bovine Serum Albumin in a Gomphosis Structure Inhibiting Amyloid Formation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 8207, 2 nov. 2020.

LUPATINI, A. L. et al. Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 3, p. 724–732, fev. 2017.

LYMAN, M. et al. Neuroinflammation: The role and consequences. **Neuroscience Research**, v. 79, p. 1–12, fev. 2014.

LYU, J. et al. The Effects of Music Therapy on Cognition, Psychiatric Symptoms, and Activities of Daily Living in Patients with Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 64, n. 4, p. 1347–1358, 24 jul. 2018

MA, F.-C. et al. Meta-Analysis of the Association between Variants in ABCA7 and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 63, n. 4, p. 1261–1267, 30 maio 2018.

MA, J. et al. MS4A6A genotypes are associated with the atrophy rates of Alzheimer's disease related brain structures. **Oncotarget**, v. 7, n. 37, p. 58779–58788, 13 set. 2016.

MA, J.; YU, J.-T.; TAN, L. MS4A Cluster in Alzheimer's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 51, n. 3, p. 1240–1248, 1 jun. 2015.

MANN, D. M.; YATES, P. O.; MARCYNIUK, B. A comparison of changes in the nucleus basalis and locus caeruleus in Alzheimer's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 47, n. 2, p. 201–203, 1 fev. 1984.

MARÍN-PRIDA, J. et al. Phycocyanobilin Promotes PC12 Cell Survival and Modulates Immune and Inflammatory Genes and Oxidative Stress Markers in Acute

Cerebral Hypoperfusion in Rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, n. 1, p. 49–60, out. 2013.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469–474, set. 1974

MARKS, J. L. et al. Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. **Endocrinology**, v. 127, n. 6, p. 3234–3236, dez. 1990.

MARLES, R. J. et al. United States Pharmacopeia Safety Evaluation of Spirulina. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 7, p. 593–604, ago. 2011.

MASTERS, C. L. et al. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 12, p. 4245–4249, 1 jun. 1985.

MATAMOROS, B. P.-; PRIDA, J. M.-; ROL, G. P.-. Nutraceutical and Therapeutic Potential of Phycocyanobilin for Treating Alzheimer's Disease. **Journal of Biosciences**, v. 46, p. 42, 2021

MATSUNAGA, S. et al. The efficacy and safety of memantine for the treatment of Alzheimer's disease. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 17, n. 10, p. 1053–1061, 3 out. 2018.

MAURER, K.; VOLK, S.; GERBALDO, H. Auguste D and Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 349, n. 9064, p. 1546–1549, maio 1997.

MAYEUX, R.; STERN, Y. Epidemiology of Alzheimer Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 8, p. a006239–a006239, 1 ago. 2012.

MENDEZ, M. F. The Relationship Between Anxiety and Alzheimer's Disease¹. **Journal of Alzheimer's Disease Reports**, v. 5, n. 1, p. 171–177, 8 mar. 2021.

MICHAILIDIS, M. et al. Alzheimer's Disease as Type 3 Diabetes: Common Pathophysiological Mechanisms between Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, p. 2687, 28 fev. 2022.

MINTER, M. R.; TAYLOR, J. M.; CRACK, P. J. The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 136, n. 3, p. 457–474, fev. 2016.

MATAMOROS, B. P; PRIDA, J. M; ROL, G. P. Nutraceutical and Therapeutic Potential of Phycocyanobilin for Treating Alzheimer's Disease. **Journal of Biosciences**, v. 46, p. 42, 2021.

MITRA, S.; SIDDIQUI, W. A.; KHANDELWAL, S. C-Phycocyanin protects against acute tributyltin chloride neurotoxicity by modulating glial cell activity along with its

antioxidant and anti-inflammatory property: A comparative efficacy evaluation with N-acetyl cysteine in adult rat brain. **Chemico-Biological Interactions**, v. 238, p. 138–150, ago. 2015.

MOHAMED NOUR, A. elazeim A.; JIAO, Y.; TENG, G.-J. Neuroanatomical associations of depression, anxiety and apathy neuropsychiatric symptoms in patients with Alzheimer's disease. **Acta Neurologica Belgica**, v. 121, n. 6, p. 1469–1480, 21 dez. 2021.

MOLINA-MARTÍNEZ, P. et al. Microglial Hyperreactivity Evolved to Immunosuppression in the Hippocampus of a Mouse Model of Accelerated Aging and Alzheimer's Disease Traits. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 12, 28 jan. 2021.

MORADI-KOR, N. et al. <p>Protective Effects of Spirulina platensis, Voluntary Exercise and Environmental Interventions Against Adolescent Stress-Induced Anxiety and Depressive-Like Symptoms, Oxidative Stress and Alterations of BDNF and 5HT-3 Receptors of the Prefrontal Cortex in Female Rats</p>. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. Volume 16, p. 1777–1794, jul. 2020.

MORADI-KOR, N. et al. Beneficial effects of *Spirulina platensis*, voluntary exercise and environmental enrichment against adolescent stress induced deficits in cognitive functions, hippocampal BDNF and morphological remodeling in adult female rats. **Hormones and Behavior**, v. 112, p. 20–31, jun. 2019.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.

MORRIS, J. C. Clinical Dementia Rating: A Reliable and Valid Diagnostic and Staging Measure for Dementia of the Alzheimer Type. **International Psychogeriatrics**, v. 9, n. S1, p. 173–176, 10 dez. 1997.

MORRIS, M. C. et al. "Nutrients and bioactives in green leafy vegetables and cognitive decline: Prospective study." **Neurology** vol. 90,3, 214-e222, 2018.

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 11, n. 1, p. 47–60, maio 1984.

MOSCONI, L. et al. Hypometabolism exceeds atrophy in presymptomatic early-onset familial Alzheimer's disease. **Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 47, n. 11, p. 1778–86, nov. 2006.

MOSCOVITCH, M. Memory and Working-with-Memory: A Component Process Model Based on Modules and Central Systems. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 4(3), 257–267, 1992.

MÜLLER, D. et al. Streptozotocin increases free fatty acids and decreases phospholipids in rat brain. **Journal of Neural Transmission**, v. 105, n. 10–12, p. 1271–1281, 16 dez. 1998.

MURER, M. G.; YAN, Q.; RAISMAN-VOZARI, R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, v. 63, n. 1, p. 71–124, 2001.

MURER, M.; YAN, Q.; RAISMAN-VOZARI, R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, v. 63, n. 1, p. 71–124, jan. 2001.

MURPHY, M. P.; LEVINE, H. Alzheimer's Disease and the Amyloid- β Peptide. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 19, n. 1, p. 311–323, 6 jan. 2010.

MYEKU, N.; CLELLAND, C. L.; EMRANI, S.; KUKUSHKIN, N. v; YU, W. H.; GOLDBERG, A. L.; DUFF, K. E. Tau-driven 26S proteasome impairment and cognitive dysfunction can be prevented early in disease by activating cAMP-PKA signaling. **Nature Medicine**, v. 22, n. 1, p. 46–53, 21 jan. 2016.

NACKENOFF, A. G. et al. PLD3 is a neuronal lysosomal phospholipase D associated with β -amyloid plaques and cognitive function in Alzheimer's disease. **PLOS Genetics**, v. 17, n. 4, p. e1009406, 8 abr. 2021

NAIK, R. S. et al. Effects of Rivastigmine and Donepezil on Brain Acetylcholine Levels in Acetylcholinesterase-Deficient Mice. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 1, p. 79, 8 abr. 2009.

NAJEM, D. et al. Insulin resistance, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. **Reviews in the Neurosciences**, v. 25, n. 4, 1 jan. 2014.

NARAYAN, P. et al. PICALM Rescues Endocytic Defects Caused by the Alzheimer's Disease Risk Factor APOE4. **Cell Reports**, v. 33, n. 1, p. 108224, out. 2020.

NG, A. et al. IL-1 β , IL-6, TNF- α and CRP in Elderly Patients with Depression or Alzheimer's disease:

NICHOLS, E. et al. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet Public Health**, v. 7, n. 2, p. e105–e125, fev. 2022.

NITSCH, R.; HOYER, S. Local action of the diabetogenic drug, streptozotocin, on glucose and energy metabolism in rat brain cortex. **Neuroscience Letters**, v. 128, n. 2, p. 199–202, jul. 1991.

NOVAK, V. et al. Enhancement of Vasoreactivity and Cognition by Intranasal Insulin in Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 37, n. 3, p. 751–759, 1 mar. 2014.

O'BRIEN, R. J.; WONG, P. C. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. **Annual Review of Neuroscience**, v. 34, n. 1, p. 185–204, 21 jul. 2011.

O'CALLAGHAN, J. P.; SRIRAM, K. Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 4, n. 3, p. 433–442, 10 maio 2005.

OH, S.-B. et al. Clusterin contributes to early stage of Alzheimer's disease pathogenesis. **Brain Pathology**, v. 29, n. 2, p. 217–231, mar. 2019.

OJOPI et al. Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer. **Rev. Psiq. Clín.** 31 (1);26-33, 2004

OLAJIDE, O. J. et al. Hippocampal Degeneration and Behavioral Impairment During Alzheimer-Like Pathogenesis Involves Glutamate Excitotoxicity. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 71, n. 6, p. 1205–1220, 8 jun. 2021.

OLIVEIRA, C.A. et al. Potencial nutricional, funcional e terapêutico da cianobactéria *Spirulina*. **RASBRAN**, v. 5, n. 1, p. 52-59, 2013.

ONO, K.; YAMADA, M. Vitamin A and Alzheimer's disease. **Geriatrics & Gerontology International**, v. 12, n. 2, p. 180–188, abr. 2012.

ONYANGO, I. G. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. **Biomedicines**, v. 9, n. 5, p. 524, 7 maio 2021.

OPITZ B. Memory function and the hippocampus. **Front Neurol Neurosci**, 34:51-9, 2014

PAASILA, P. J. et al. Synapses, Microglia, and Lipids in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, 12 jan. 2022.

PACHECO, S. M. et al. 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, jun. 2018.

PACHECO, S. M. et al. 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, jun. 2018

PADURARIU, M. et al. Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 469, n. 1, p. 6–10, jan. 2010.

PANTEL, J. et al. Distribution of cerebral atrophy assessed by magnetic resonance imaging reflects patterns of neuropsychological deficits in Alzheimer's dementia. **Neuroscience Letters**, v. 361, n. 1–3, p. 17–20, maio 2004.

PARK, K. M.; BOWERS, W. J. Tumor necrosis factor- α mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. **Cellular Signalling**, v. 22, n. 7, p. 977–983, jul. 2010.

PATTERSON, S. L. Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: Interactions of microglia, IL-1 β , BDNF and synaptic plasticity. **Neuropharmacology**, v. 96, p. 11–18, set. 2015.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Gulf Professional Publishing, 2004.

PEKNY, M.; WILHELMSSON, U.; PEKNA, M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. **Neuroscience Letters**, v. 565, p. 30–38, abr. 2014.

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

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and Anxiogenic Drug Effects on Exploratory Activity in an Elevated Plus-Maze: a Novel Test of Anxiety in the Rat. *Pharmacology Biochemistry & behavior*, [S.l.], v. 24, p. 525-529, 1986.

PÉREZ-JUÁREZ, A. et al. Neuroprotective effect of *Arthrospira* (Spirulina) *platensis* against kainic acid-neuronal death. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 8, p. 1408–1412, 2 ago. 2016

PERRY, V. H.; NICOLL, J. A. R.; HOLMES, C. Microglia in neurodegenerative disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 6, n. 4, p. 193–201, 16 abr. 2010.

PETTERSEN, E. F. et al. <scp>UCSF ChimeraX</scp> : Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein Science**, v. 30, n. 1, p. 70–82, 22 jan. 2021.

PIÑERO ESTRADA, J. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **Il Farmaco**, v. 56, n. 5–7, p. 497–500, 1 jul. 2001.

PIOVAN, A. et al. Carotenoid Extract Derived from *Euglena gracilis* Overcomes Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation in Microglia: Role of NF- κ B and Nrf2 Signaling Pathways. **Molecular Neurobiology**, v. 58, n. 7, p. 3515–3528, 21 jul. 2021.

PIOVAN, A. et al. Pre- and Early Post-treatment With *Arthrospira platensis* (Spirulina) Extract Impedes Lipopolysaccharide-triggered Neuroinflammation in Microglia. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 9 set. 2021.

PLUM, L.; SCHUBERT, M.; BRÜNING, J. C. The role of insulin receptor signaling in the brain. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 16, n. 2, p. 59–65, mar. 2005.

POOLER, A. M.; NOBLE, W.; HANGER, D. P. A role for tau at the synapse in Alzheimer's disease pathogenesis. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 1–8, jan. 2014.

População idosa brasileira deve aumentar até 2060. (n.d.). Retrieved January 29, 2022, from https://www.ipea.gov.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=33875

PRATICÒ, D. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 12, p. 609–615, dez. 2008.

PROITSI, P. et al. Alzheimer's disease susceptibility variants in the MS4A6A gene are associated with altered levels of MS4A6A expression in blood. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 2, p. 279–290, fev. 2014.

PUGAZHENTHI, S.; QIN, L.; REDDY, P. H. Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 5, p. 1037–1045, maio 2017.

QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 4, p. 329–344, 28 jan. 2010.

QUINLAN, C. L. et al. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 304–312, 2013.

RAMASSAMY, C. et al. Oxidative Insults Are Associated with Apolipoprotein E Genotype in Alzheimer's Disease Brain. **Neurobiology of Disease**, v. 7, n. 1, p. 23–37, fev. 2000.

RAMOS, J. M. J. Differential contribution of hippocampus, perirhinal cortex and postrhinal cortex to allocentric spatial memory in the radial maze. **Behavioural Brain Research**, v. 247, p. 59–64, jun. 2013.

RAVELLI, K. G.; ROSÁRIO, B. dos 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, n. 3, p. 327–333, 2 abr. 2017.

RAY, P. D.; HUANG, B.-W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 5, p. 981–990, maio 2012.

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

REDDY, P. H. et al. Abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration as early events in Alzheimer's disease: Implications to mitochondria-targeted antioxidant therapeutics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 5, p. 639–649, maio 2012.

REDDY, P. H. et al. Mutant APP and amyloid beta-induced defective autophagy, mitophagy, mitochondrial structural and functional changes and synaptic damage in hippocampal neurons from Alzheimer's disease. **Human Molecular Genetics**, v. 27, n. 14, p. 2502–2516, 15 jul. 2018.

REDDY, P. H.; BEAL, M. F. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 14, n. 2, p. 45–53, fev. 2008.

REDROBE, J. P. et al. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor activation ameliorates scopolamine-induced behavioural changes in a modified continuous Y-maze task in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 602, n. 1, p. 58–65, jan. 2009.

REHMAN, M. U. et al. Neuroprotective Strategies for Neurological Disorders by Natural Products: An update. **Current Neuropharmacology**, v. 17, n. 3, p. 247–267, 14 fev. 2019.

REITZ, C. et al. Memory performance is related to amyloid and tau pathology in the hippocampus. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 80, n. 7, p. 715–721, 1 jul. 2009.

RODRÍGUEZ-ARELLANO, J. J. et al. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 323, p. 170–182, maio 2016.

ROLLS, E. T. The storage and recall of memories in the hippocampo-cortical system. **Cell and Tissue Research**, v. 373, n. 3, p. 577–604, 7 set. 2018.

Román, G C et al. "Mediterranean diet: The role of long-chain ω -3 fatty acids in fish; polyphenols in fruits, vegetables, cereals, coffee, tea, cacao and wine; probiotics and vitamins in prevention of stroke, age-related cognitive decline, and Alzheimer disease." *Revue neurologique* vol. 175,10 (2019).

ROMÁN, G. C. et al. Mediterranean diet: The role of long-chain ω -3 fatty acids in fish; polyphenols in fruits, vegetables, cereals, coffee, tea, cacao and wine; probiotics and vitamins in prevention of stroke, age-related cognitive decline, and Alzheimer disease. **Revue Neurologique**, v. 175, n. 10, p. 724–741, dez. 2019.

ROSALES-CORRAL, S. et al. Diabetes and Alzheimer Disease, Two Overlapping Pathologies with the Same Background: Oxidative Stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1–14, 2015.

ROSENE, MATTHEW J et al. "Defining the role of PLD3 in Alzheimer disease pathology." ***Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*** vol. 17 Suppl 3 (2021).

ROY, A. et al. Cognitive Dysfunction and Anxiety Resulting from Synaptic Downscaling, Hippocampal Atrophy, and Ventricular Enlargement with Intracerebroventricular Streptozotocin Injection in Male Wistar Rats. **Neurotoxicity Research**, 7 set. 2022.

ROZEMULLER, A. J. M.; VAN GOOL, W. A.; EIKELENBOOM, P. The neuroinflammatory response in plaques and amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: therapeutic implications. **Current drug targets. CNS and neurological disorders**, v. 4, n. 3, p. 223–33, jun. 2005.

RUSSO, I.; BARLATI, S.; BOSETTI, F. Effects of neuroinflammation on the regenerative capacity of brain stem cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 116, n. 6, p. 947–956, mar. 2011.

SALENTIN, S. et al. PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W443–W447, 1 jul. 2015.

SALKOVIC-PETRISIC, M.; HOYER, S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. Em: **Neuropsychiatric Disorders An Integrative Approach**. Vienna: Springer Vienna, 2007. p. 217–233

SANTA-MARIA, I.; VARGHESE, M.; KSIĘŻAK-REDING, H.; DZHUN, A.; WANG, J.; PASINETTI, G. M. Paired Helical Filaments from Alzheimer Disease Brain Induce Intracellular Accumulation of Tau Protein in Aggresomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 24, p. 20522–20533, jun. 2012.

SAO, T. et al. *MEF2C* mRNA expression and cognitive function in Japanese patients with Alzheimer's disease. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 72, n. 3, p. 160–167, mar. 2018

SARTER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D. N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. **Psychopharmacology**, v. 94, n. 4, p. 491–495, abr. 1988.

SATOH, J. et al. PLD3 is accumulated on neuritic plaques in Alzheimer's disease brains. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 6, n. 5–8, p. 70, 2 dez. 2014

SAXENA, G.; PATRO, I. K.; NATH, C. ICV STZ induced impairment in memory and neuronal mitochondrial function: A protective role of nicotinic receptor. **Behavioural Brain Research**, v. 224, n. 1, p. 50–57, out. 2011.

SAXENA, M.; DUBEY, R. Target Enzyme in Alzheimer's Disease: Acetylcholinesterase Inhibitors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 264–275, 11 abr. 2019.

SCHEFF, S. W. et al. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Neurobiology of Aging**, v. 27, n. 10, p. 1372–1384, out. 2006.

SCHEFF, S. W. et al. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. **Neurology**, v. 68, n. 18, p. 1501–1508, 1 maio 2007.

SCHMATZ, R. et al. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 610, n. 1–3, p. 42–48, maio 2009.

SCHMIDT, M. F. et al. Ubiquitin signalling in neurodegeneration: mechanisms and therapeutic opportunities. **Cell Death & Differentiation**, v. 28, n. 2, p. 570–590, 7 fev. 2021.

SCHUITEMAKER, A. et al. Inflammatory markers in AD and MCI patients with different biomarker profiles. **Neurobiology of Aging**, v. 30, n. 11, p. 1885–1889, nov. 2009.

SELKOE, D. J. Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure. **Science**, v. 298, n. 5594, p. 789–791, 25 out. 2002.

SELKOE, D. J. Alzheimer's Disease--Genotypes, Phenotype, and Treatments. **Science**, v. 275, n. 5300, p. 630–631, 31 jan. 1997.

SEO, E.-J.; FISCHER, N.; EFFERTH, T. Phytochemicals as inhibitors of NF- κ B for treatment of Alzheimer's disease. **Pharmacological Research**, v. 129, p. 262–273, mar. 2018.

SERRANO-POZO, A. et al. A Phenotypic Change But Not Proliferation Underlies Glial Responses in Alzheimer Disease. **The American Journal of Pathology**, v. 182, n. 6, p. 2332–2344, jun. 2013.

SERRANO-POZO, A.; FROSCH, M. P.; MASLIAH, E.; HYMAN, B. T. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, p. a006189–a006189, 1 set. 2011.

SHARMA, K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). **Molecular Medicine Reports**, 11 jun. 2019.

SHARMA, M.; GUPTA, Y. K. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. **Life Sciences**, v. 68, n. 9, p. 1021–1029, jan. 2001.

SHENG, M.; SABATINI, B. L.; SUDHOF, T. C. Synapses and Alzheimer's Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 5, p. a005777–a005777, 1 maio 2012.

SHEPPARD, O.; COLEMAN, M. Alzheimer's Disease: Etiology, Neuropathology and Pathogenesis. Em: **Alzheimer's Disease: Drug Discovery**. [s.l.] Exon Publications, 2020. p. 1–22

SHERMAN, K. A. et al. Presynaptic cholinergic mechanisms in brain of aged rats with memory impairments. **Neurobiology of Aging**, v. 2, n. 2, p. 99–104, jun. 1981.

SHINGO, A. S. et al. Intracerebroventricular administration of an insulin analogue recovers STZ-induced cognitive decline in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 241, p. 105–111, mar. 2013

SIBANYONI, M. N. et al. Isolation, in vitro evaluation and molecular docking of acetylcholinesterase inhibitors from South African Amaryllidaceae. **Fitoterapia**, v. 146, p. 104650, out. 2020.

SIMON, J. P. et al. Evidence of antidiabetic activity of *Spirulina fusiformis* against streptozotocin-induced diabetic Wistar albino rats. **3 Biotech**, v. 8, n. 2, p. 129, 13 fev. 2018.

SIMPSON, D. S. A.; OLIVER, P. L. ROS Generation in Microglia: Understanding Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease. **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 743, 13 ago. 2020.

SIMPSON, J. E. et al. Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. **Neurobiology of Aging**, v. 31, n. 4, p. 578–590, abr. 2010.

SINGH, N. et al. Quantifying anatomical shape variations in neurological disorders. **Medical Image Analysis**, v. 18, n. 3, p. 616–633, abr. 2014

SINHA, S. et al. Maternal *Spirulina* supplementation during pregnancy and lactation partially prevents oxidative stress, glial activation and neuronal damage in protein malnourished F1 progeny. **Neurochemistry International**, v. 141, p. 104877, dez. 2020.

SKAPER, S. D. et al. Synaptic Plasticity, Dementia and Alzheimer Disease. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 16, n. 3, p. 220–233, 12 abr. 2017.

SKAPER, S. D. et al. Synaptic Plasticity, Dementia and Alzheimer Disease. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 16, n. 3, p. 220–233, 12 abr. 2017.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 1, p. 7–35, 10 jan. 2010.

SOLANA, C.; TARAZONA, R.; SOLANA, R. Immunosenescence of Natural Killer Cells, Inflammation, and Alzheimer's Disease. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2018, p. 1–9, 1 nov. 2018.

SOLARI, N.; HANGYA, B. Cholinergic modulation of spatial learning, memory and navigation. **European Journal of Neuroscience**, v. 48, n. 5, p. 2199–2230, set. 2018.

SORIA LOPEZ, J. A.; GONZÁLEZ, H. M.; LÉGER, G. C. Alzheimer's disease. In: [s.l.: s.n.].p. 231–255.

SORIAL, M. E.; EL SAYED, N. S. E. D. Protective effect of valproic acid in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease mouse model: possible involvement of the cholinergic system. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 390, n. 6, p. 581–593, 10 jun. 2017

SORRENTI, V. et al. *Spirulina* Microalgae and Brain Health: A Scoping Review of Experimental and Clinical Evidence. **Marine Drugs**, v. 19, n. 6, p. 293, 22 maio 2021

SPIRES, T. L.; HYMAN, B. T. Transgenic models of Alzheimer's disease: Learning from animals. **NeuroRX**, v. 2, n. 3, p. 423–437, jul. 2005.

SQUIRE, L. R.; DEDE, A. J. O. Conscious and Unconscious Memory Systems. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 3, p. a021667, 2 mar. 2015.

SQUIRE, L. R.; ZOLA, S. M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 24, p. 13515–13522, 26 nov. 1996.

STEEN, E. et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease – is this type 3 diabetes? **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 7, n. 1, p. 63–80, 3 mar. 2005.

STEWART, W. F. et al. Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. **Neurology**, v. 48, n. 3, p. 626–632, mar. 1997.

STRAUSS, E., SHERMAN, E. M. S. SPREEN, O. (2006). A compendium of neuropsychological tests: Administration, norms, and commentary. (3rd ed.). Oxford University Press.

STRÖMBERG, I. et al. Blueberry- and spirulina-enriched diets enhance striatal dopamine recovery and induce a rapid, transient microglia activation after injury of the rat nigrostriatal dopamine system. **Experimental Neurology**, v. 196, n. 2, p. 298–307, dez. 2005.

SUBRAMANIAN, S.; MADHAVADAS, S. Combination of Spirulina with glycyrrhizin prevents cognitive dysfunction in aged obese rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 39, 2015.

SUH, Y.-H. Amyloid Precursor Protein, Presenilins, and alpha -Synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer's Disease. **Pharmacological Reviews**, v. 54, n. 3, p. 469–525, 1 set. 2002

SULTANA, R. et al. Increased Protein and Lipid Oxidative Damage in Mitochondria Isolated from Lymphocytes from Patients with Alzheimer's Disease: Insights into the Role of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease and Initial Investigations into a Potential Biomarker for this Dementing Disorder. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 24, n. 1, p. 77–84, 29 mar. 2011.

SUN, Y. et al. Metabolism: A Novel Shared Link between Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease. **Journal of Diabetes Research**, v. 2020, p. 1–12, 30 jan. 2020.

SWARDFAGER, W. et al. A Meta-Analysis of Cytokines in Alzheimer's Disease. **Biological Psychiatry**, v. 68, n. 10, p. 930–941, nov. 2010.

SZKUDELSKI T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res**, v. 50, n. 6, p. 537-46, 2001

TABÁK, A. G. et al. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. **The Lancet**, v. 379, n. 9833, p. 2279–2290, jun. 2012.

TAKASU, N. et al. Streptozocin- and alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H₂O₂ as mediator for DNA fragmentation. **Diabetes**, v. 40, n. 9, p. 1141–5, set. 1991.

TAKEHARA-NISHIUCHI, K. Neurobiology of systems memory consolidation. **European Journal of Neuroscience**, v. 54, n. 8, p. 6850–6863, 25 out. 2021.

TALEBI, M. et al. ABCA7 and EphA1 Genes Polymorphisms in Late-Onset Alzheimer's Disease. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 70, n. 2, p. 167–173, 28 fev. 2020.

TAO, Q.-Q.; CHEN, Y.-C.; WU, Z.-Y. The role of CD2AP in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Aging and disease**, v. 10, n. 4, p. 901, 2019.

TARKOWSKI, E. Intrathecal inflammation precedes development of Alzheimer's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 74, n. 9, p. 1200–1205, 1 set. 2003.

TAYANLOO-BEIK, A.; KIASALARI, Z.; ROGHANI, M. Paeonol Ameliorates Cognitive Deficits in Streptozotocin Murine Model of Sporadic Alzheimer's Disease via Attenuation of Oxidative Stress, Inflammation, and Mitochondrial Dysfunction. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 72, n. 2, p. 336–348, 19 fev. 2022.

TEJEDA, G.; DÍAZ-GUERRA, M. Integral Characterization of Defective BDNF/TrkB Signalling in Neurological and Psychiatric Disorders Leads the Way to New Therapies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 268, 28 jan. 2017.

TERAO, I.; HONYASHIKI, M.; INOUE, T. Comparative efficacy of lithium and aducanumab for cognitive decline in patients with mild cognitive impairment or Alzheimer's disease: A systematic review and network meta-analysis. **Ageing Research Reviews**, v. 81, p. 101709, nov. 2022

THAPA, S.; LV, M.; XU, H. Acetylcholinesterase: A Primary Target for Drugs and Insecticides. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 17, 7 nov. 2017.

The Progression of Alzheimer's Disease | BrightFocus Foundation. Disponível em: <<https://www.brightfocus.org/alzheimers-disease/infographic/progression-alzheimers-disease>>. Acesso em: 10 dez. 2022.

THINAKARAN, G.; KOO, E. H. Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 44, p. 29615–29619, out. 2008.

THOMÉ, G. R. et al. Selenothymidine protects against biochemical and behavioral alterations induced by ICV-STZ model of dementia in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 294, p. 135–143, out. 2018.

THOMPSON, R. F.; KIM, J. J. Memory systems in the brain and localization of a memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 24, p. 13438–13444, 26 nov. 1996.

TIWARI, V. et al. Chronic treatment with tocotrienol, an isoform of vitamin E, prevents intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive impairment and oxidative–nitrosative stress in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 93, n. 2, p. 183–189, ago. 2009.

TIWARI, V. et al. Protriptyline improves spatial memory and reduces oxidative damage by regulating NFkB-BDNF/CREB signaling axis in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. **Brain Research**, v. 1754, p. 147261, mar. 2021.

TIWARI, V.; KUHAD, A.; BISHNOI, M.; CHOPRA, K. Chronic treatment with tocotrienol, an isoform of vitamin E, prevents intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive impairment and oxidative–nitrosative stress in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 93, n. 2, p. 183–189, ago. 2009.

TÖNNIES, E.; TRUSHINA, E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 57, n. 4, p. 1105–1121, 19 abr. 2017.

TORRES, L. L. et al. Peripheral Oxidative Stress Biomarkers in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 26, n. 1, p. 59–68, 26 ago. 2011.

TRACY, T. E. et al. Tau interactome maps synaptic and mitochondrial processes associated with neurodegeneration. **Cell**, v. 185, n. 4, p. 712–728.e14, fev. 2022.

TREUSCH, S. et al. Functional Links Between A β Toxicity, Endocytic Trafficking, and Alzheimer's Disease Risk Factors in Yeast. **Science**, v. 334, n. 6060, p. 1241–1245, 2 dez. 2011.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, p. NA-NA, 2009.

TROTTA, T. et al. Beneficial Effects of Spirulina Consumption on Brain Health. **Nutrients**, v. 14, n. 3, p. 676, 5 fev. 2022.

TSAI, A. P. et al. INPP5D expression is associated with risk for Alzheimer's disease and induced by plaque-associated microglia. **Neurobiology of Disease**, v. 153, p. 105303, jun. 2021.

TU, S. et al. Lost in spatial translation – A novel tool to objectively assess spatial disorientation in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. **Cortex**, v. 67, p. 83–94, jun. 2015.

UBELMANN, F. et al. Bin1 and $\text{CD}2\text{AP}$ polarise the endocytic generation of beta-amyloid. **EMBO reports**, v. 18, n. 1, p. 102–122, 28 jan. 2017

UTTARA, B. et al. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. **Current Neuropharmacology**, v. 7, n. 1, p. 65–74, 1 mar. 2009.

VADIRAJA, B. B.; MADYASTHA, K. M. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 285, n. 2, p. 262–266, 2001.

VECCHIO, I. et al. The State of The Art on Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's Disease. **Journal of Central Nervous System Disease**, v. 13, p. 117957352110291, 7 jan. 2021.

VENIGALLA, M. et al. Novel promising therapeutics against chronic neuroinflammation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, v. 95, p. 63–74, maio 2016.

VERMA, M.; HOWARD, R. J. Semantic memory and language dysfunction in early Alzheimer's disease: a review. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 27, n. 12, p. 1209–1217, dez. 2012.

VILLEMAGNE, V. L. et al. $\text{A}\beta$ -amyloid and Tau Imaging in Dementia. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 47, n. 1, p. 75–88, jan. 2017

VISHNU, V. Y. et al. Role of Plasma Clusterin in Alzheimer's Disease—A Pilot Study in a Tertiary Hospital in Northern India. **PLOS ONE**, v. 11, n. 11, p. e0166369, 18 nov. 2016.

VISWANATHAN, A.; GREENBERG, S. M. Cerebral amyloid angiopathy in the elderly. **Annals of Neurology**, v. 70, n. 6, p. 871–880, dez. 2011.

VON BERNHARDI, R. et al. Acetylcholinesterase induces the expression of the β -amyloid precursor protein in glia and activates glial cells in culture. **Neurobiology of Disease**, v. 14, n. 3, p. 447–457, dez. 2003.

WALSH, D. M.; TELOW, D. B. Alzheimer's Disease and the Amyloid β -Protein. In: [s.l: s.n.]p. 101–124.

WANG, H. et al. Ameliorating effect of luteolin on memory impairment in an Alzheimer's disease model. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 5, p. 4215–4220, maio 2016.

WANG, H. et al. HMG-1 as a Late Mediator of Endotoxin Lethality in Mice. **Science**, v. 285, n. 5425, p. 248–251, 9 jul. 1999.

WANG, J.; YU, J.-T.; TAN, L. PLD3 in Alzheimer's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 51, n. 2, p. 480–486, 17 abr. 2015.

WANG, P. et al. Amelioration of cognitive deficits by *Spirulina platensis* in L-methionine-induced rat model of vascular dementia. **Pharmacognosy Magazine**, v. 16, n. 68, p. 133, 2020.

WANG, R.; REDDY, P. H. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 57, n. 4, p. 1041–1048, 19 abr. 2017.

WANG, Z.-C.; ZHAO, J.; LI, S. Dysregulation of synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors induced by amyloid- β . **Neuroscience Bulletin**, v. 29, n. 6, p. 752–760, 17 dez. 2013.

WANG, Z.-H. et al. Deficiency in BDNF/TrkB Neurotrophic Activity Stimulates δ -Secretase by Upregulating C/EBP β in Alzheimer's Disease. **Cell Reports**, v. 28, n. 3, p. 655–669.e5, jul. 2019.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2 jul. 2018.

WATSON, G. S.; CRAFT, S. Modulation of memory by insulin and glucose: neuropsychological observations in Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 490, n. 1–3, p. 97–113, abr. 2004.

WATSON, G. S.; CRAFT, S. The Role of Insulin Resistance in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **CNS Drugs**, v. 17, n. 1, p. 27–45, 2003.

WEI, Z.; KOYA, J.; REZNIK, S. E. Insulin Resistance Exacerbates Alzheimer Disease via Multiple Mechanisms. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, 19 jul. 2021.

WEINSTOCK, M.; SHOHAM, S. Rat models of dementia based on reductions in regional glucose metabolism, cerebral blood flow and cytochrome oxidase activity. **Journal of Neural Transmission**, v. 111, n. 3, p. 347–366, 1 mar. 2004.

WHITEHOUSE, P. et al. Alzheimer's Disease and Senile Dementia: Loss of Neurons in the Basal Forebrain. **Science**, v. 215, n. 4537, p. 1237–1239, 5 mar. 1982.

WILLETTE, A. A. et al. Insulin Resistance, Brain Atrophy, and Cognitive Performance in Late Middle-Aged Adults. **Diabetes Care**, v. 36, n. 2, p. 443–449, 1 fev. 2013.

WILLIAMS, T. I. et al. Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 27, n. 8, p. 1094–1099, ago. 2006.

WILLNOW, T. E.; ANDERSEN, O. M. Sorting receptor SORLA – a trafficking path to avoid Alzheimer disease. **Journal of Cell Science**, 1 jan. 2013.

WINTERS, B. D.; SAKSIDA, L. M.; BUSSEY, T. J. Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 5, p. 1055–1070, jul. 2008.

WISCHIK, C. M. et al. Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 13, p. 4884–4888, jul. 1988.

WISCHIK, C. M.; NOVAK, M.; EDWARDS, P. C.; KLUG, A.; TICHELAAR, W.; CROWTHER, R. A. Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 13, p. 4884–4888, jul. 1988.

WU, Q. et al. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 8, p. 1817–1840, 3 ago. 2016.

XIA, P. et al. Memantine Preferentially Blocks Extrasynaptic over Synaptic NMDA Receptor Currents in Hippocampal Autapses. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 33, p. 11246–11250, 18 ago. 2010.

XU, W. et al. Association of Alzheimer's disease risk variants on the *PICALM* gene with *PICALM* expression, core biomarkers, and feature neurodegeneration. **Aging**, v. 12, n. 21, p. 21202–21219, 7 nov. 2020.

XU, W. et al. The Effect of Borderline Diabetes on the Risk of Dementia and Alzheimer's Disease. **Diabetes**, v. 56, n. 1, p. 211–216, 1 jan. 2007.

XU, W.; TAN, L.; YU, J.-T. The Role of *PICALM* in Alzheimer's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 52, n. 1, p. 399–413, 4 ago. 2015

YAHFOUFI, N. et al. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1618, 2 nov. 2018.

YANG, J. et al. TREM2 ectodomain and its soluble form in Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 204, 7 dez. 2020

YANG, W. et al. Sulforaphene Ameliorates Neuroinflammation and Hyperphosphorylated Tau Protein via Regulating the PI3K/Akt/GSK-3 β Pathway in Experimental Models of Alzheimer's Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–17, 11 set. 2020.

YAO, J. et al. Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 34, p. 14670–14675, 25 ago. 2009.

YIN, R.-H.; YU, J.-T.; TAN, L. The Role of *SORL1* in Alzheimer's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 51, n. 3, p. 909–918, 16 jun. 2015.

YUSKAITIS, C. J.; JOPE, R. S. Glycogen synthase kinase-3 regulates microglial migration, inflammation, and inflammation-induced neurotoxicity. **Cellular Signalling**, v. 21, n. 2, p. 264–273, fev. 2009.

ZAJAC, DIANA ET AL. "Expression of the microglial INPP5D isoforms as a function of Alzheimer's disease status and genetics." **Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association** vol. 17 Suppl 3, 2021.

ZHANG, Y. et al. Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: GSK-3 β as a potential link. **Behavioural Brain Research**, v. 339, p. 57–65, fev. 2018.

ZHANG, Z.-G. et al. Inflammation in Alzheimer's Disease and Molecular Genetics: Recent Update. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 63, n. 5, p. 333–344, 1 out. 2015

ZHAO, Q.-F. et al. ABCA7 in Alzheimer's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 51, n. 3, p. 1008–1016, 31 jun. 2015.

ZHAO, Y.; ZHAO, B. Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 1–10, 2013.

ZHENG, C.; ZHOU, X.-W.; WANG, J.-Z. The dual roles of cytokines in Alzheimer's disease: update on interleukins, TNF- α , TGF- β and IFN- γ . **Translational Neurodegeneration**, v. 5, n. 1, p. 7, 5 dez. 2016.

ZHENG, Q. et al. Inhibition of the Self-Assembly of A β and of Tau by Polyphenols: Mechanistic Studies. **Molecules**, v. 24, n. 12, p. 2316, 22 jun. 2019.

ZHOU, S. et al. Neuroprotective effects of edaravone on cognitive deficit, oxidative stress and tau hyperphosphorylation induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. **NeuroToxicology**, v. 38, p. 136–145, set. 2013.

ZHOU, Y. et al. Intracellular Clusterin Interacts with Brain Isoforms of the Bridging Integrator 1 and with the Microtubule-Associated Protein Tau in Alzheimer's Disease. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e103187, 22 jul. 2014.

ZHU, H.-Z.; ZHU, M.-J.; ZHANG, Y. [The effects of aerobic exercise plus spirulina polysaccharide supplement on learning and memory function of diabetes rats and its mechanism]. **Zhongguo ying yong sheng li xue za zhi = Zhongguo yingyong shenglixue zazhi = Chinese journal of applied physiology**, v. 37, n. 6, p. 665–672, nov. 2021

ZHU, S. et al. The role of neuroinflammation and amyloid in cognitive impairment in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 23, n. 4, p. 310–320, abr. 2017.

ZHU, X.; DAI, W.; MA, T. Impacts of CR1 genetic variants on cerebrospinal fluid and neuroimaging biomarkers in alzheimer's disease. **BMC Medical Genetics**, v. 21, n. 1, p. 181, 12 dez. 2020.

ANEXO A – CERTIFICADO CEUA UFC.



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA SPIRULINA PLATENSIS EM UM MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE ALZHEIMER INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA", protocolada sob o CEUA nº 3598100320 (ID 001679), sob a responsabilidade de **Geanne Matos de Andrade e equipe; Juliete Tavares** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 21/08/2020.

We certify that the proposal "STUDY OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF SPIRULINA PLATENSIS ON AN ANIMAL MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE INDUCED BY STREPTOZOTOCIN", utilizing 168 Heterogenics mice (168 males), protocol number CEUA 3598100320 (ID 001679), under the responsibility of **Geanne Matos de Andrade and team; Juliete Tavares** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 08/21/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 03/2020 a 12/2022

Área: Departamento de Medicina Clínica

Origem: Biotério Central da UFC

Espécie: Camundongos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 3 a 4 semanas

N: 168

Linhagem: Swiss

Peso: 25 a 35 g

Local do experimento: Todas as etapas experimentais e eutanásia serão feitas no biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, com exceção das análises bioquímicas e histológicas, que serão realizadas no Laboratório de Neurociência e Comportamento.

Fortaleza, 31 de outubro de 2022

Profa. Dra. Camila Ferreira Roncari
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará