



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

JÉSSICA RABELO BEZERRA

**EFEITO NEUROPROTETOR DO ÁCIDO CLOROGÊNICO E CAFEÍNA EM UM
MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE ALZHEIMER ESPORÁDICA INDUZIDA
POR ESTREPTOZOTOCINA**

FORTALEZA

2023

JÉSSICA RABELO BEZERRA

EFEITO NEUROPROTETOR DO ÁCIDO CLOROGÊNICO E CAFEÍNA EM UM
MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE ALZHEIMER ESPORÁDICA INDUZIDA POR
ESTREPTOZOTOCINA

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

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

FORTALEZA

2023

JÉSSICA RABELO BEZERRA

EFEITO NEUROPROTETOR DO ÁCIDO CLOROGÊNICO E CAFEÍNA EM UM
MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE ALZHEIMER ESPORÁDICA INDUZIDA POR
ESTREPTOZOTOCINA

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

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

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Fernanda Martins Maia Carvalho
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos
Universidade Federal de Sergipe (UFS)

Prof. Dr. Nuno Miguel de Jesus Machado
Fundação CHAMPALIMAUD

Prof. Dr. Rui Daniel Schroder Prediger
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

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)

- R114e Rabelo Bezerra, Jéssica.
Efeito neuroprotetor do ácido clorogênico e cafeína em um modelo animal da Doença de Alzheimer esporádica induzida por estreptozotocina / Jéssica Rabelo Bezerra. – 2023.
199 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade. .
1. Memória. 2. Neuroproteção. 3. Antioxidantes. 4. Hipocampo. 5. Córtex Pré-Frontal. I. Título.
CDD 615.1
-

Aos meus pais e minhas irmãs

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por estarem sempre presentes na minha vida, sendo um exemplo de ética, determinação e humildade. Agradeço pelo tempo, amor, compreensão e esforços dedicados à minha formação pessoal e profissional, e por sempre me apoiarem na busca dos meus sonhos.

As minhas irmãs, por todo amor, carinho e amizade. Por sempre estarem ao meu lado e me apoiarem. Além do sangue, eu as escolheria como minha família.

Aos meus amigos, pelos bons e maus momentos compartilhados, por trazerem leveza para minha vida. Em especial, ao meu amigo Neto, que me ajudou em um período muito difícil da pandemia, minha gratidão.

À Profa Dra. Geanne Matos de Andrade, que me orientou neste trabalho, pela paciência, confiança, dedicação e competência na realização desse projeto. Por ter contribuído para a minha formação científica e pela oportunidade dos ensinamentos que serão importantes para a construção da minha trajetória profissional.

Aos Professores Ricardo De Freitas Lima, Mara Yone Soares Dias Fernandes, Francisco Stefânio Barreto, por aceitarem participar da minha banca de Exame de Qualificação e por ajudarem a melhorar a qualidade deste trabalho com todas as sugestões.

Aos Professores Rui Daniel Schröder Prediger, Nuno Miguel De Jesus Machado, José Ronaldo Dos Santos e Fernanda Martins Maia Carvalho, por aceitarem participar da minha banca de Defesa e por ajudarem a melhorar a qualidade deste trabalho com todas as sugestões.

Aos colegas do Laboratório de Neurociências e Comportamento (LNC): Tyciane, Albert, Juliete, Maiara, por me ajudarem nos experimentos durante um período muito difícil em que nos encontrávamos que foi a pandemia do COVID-19; ao Arnaldo e Kelly por sempre estarem presentes e se disporem a tirar nossas dúvidas; aos demais colegas de laboratório que sempre me ajudaram quando possível, seja nos experimentos ou tornando o ambiente do laboratório mais divertido: Emanuelle, Alfaete, Jessica Pessoa, Amanda, Priscila, Ariadne, Mayara, Carol, Caio, Alexander e Gabriela.

Aos funcionários do Biotério do Núcleo de Pesquisa de Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) e Biotério da FISFAR, Alysson, Diego Abreu e Francisco Francismar pelo excelente trabalho, por toda atenção, simpatia e ajuda, o trabalho de vocês é essencial para todos os trabalhos realizados no Biotério e essa importância deve ser reconhecida por todos. Ao veterinário do biotério da FISFAR e do NPDM, Wesley Lyeverton e a veterinária Gabriela pelas contribuições nessa jornada de trabalho com animais.

Meu agradecimento em especial aos camundongos utilizados para a execução deste estudo, e que contribuíram com suas vidas para a realização deste trabalho. Sem eles este trabalho não seria possível de ser realizado.

As agencias financiadoras CAPES, CNPq e FUNCAP por terem colaborado financeiramente para a realização dessa pesquisa.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o engrandecimento deste trabalho.

A todos, minha humilde e sincera gratidão.

“A alma é tingida com a cor de seus pensamentos.”

Marco Aurélio

RESUMO

EFEITO NEUROPROTETOR DO ÁCIDO CLOROGÊNICO E CAFEÍNA EM UM MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE ALZHEIMER ESPORÁDICA INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva caracterizada pela formação de placas amiloides e de emaranhados neurofibrilares intracelulares em áreas corticais, levando à perda progressiva de memória e comprometimentos cognitivos. A DA é a forma mais comum de demência. Injeções intracerebroventriculares de estreptozotocina (ICV-STZ) têm sido utilizada como modelo experimental da DA esporádica (DAE) em roedores por causar prejuízos na sinalização cerebral da insulina, estresse oxidativo, neuroinflamação e disfunções na neurogênese, e declínio cognitivo, que são características da DAE. O Ácido Clorogênico (ACG) e Cafeína (CAF), principais compostos encontrados no café, possuem propriedade como modulação do metabolismo da glicose, propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias já descritas. O objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos do ACG e CAF sobre déficits cognitivos, dano neuronal e neuroinflamação em camundongos submetidos ao modelo experimental da DAE induzida por ICV-STZ. Camundongos Swiss machos (25-35 g) receberam ICV-STZ (3 mg/kg, 1,5 µL) bilateralmente, no dia 1 e 3 do experimento. O tratamento com o ACG (5 mg/kg, v.o.) e a CAF (15 mg/kg v.o.) ou veículo (água, v. o.) foi realizado por 26 dias, iniciando 2 h após o segundo procedimento de indução. Foi feita a medição da glicemia dos animais antes e após a indução da DAE. Os resultados demonstraram que não houve alteração significativa na glicemia. As ICV-STZ causaram déficits na memória aversiva, de reconhecimento e espacial. O tratamento com o ACG e a CAF protegeu contra os déficits na memória aversiva, de reconhecimento e espacial. A atividade locomotora, memória de trabalho e os parâmetros relacionados a ansiedade, não foram alterados. As ICV-STZ causaram um aumento das concentrações de nitrito/nitrato e MDA. O tratamento com o ACG e a CAF protegeu contra o aumento das concentrações de nitrito/nitrato e MDA no córtex e hipocampo. As ICV-STZ causaram diminuição de neurônios viáveis, depleção de BDNF e astrogliose e microgliose no córtex e hipocampo. O tratamento com o ACG e a CAF protegeu contra a diminuição de neurônios viáveis e depleção de BDNF e preveniu a astrogliose e microgliose no córtex pré-frontal e hipocampo. As análises de *docking* molecular mostraram que o ACG e CAF interagem fortemente com os alvos acetilcolinesterase (AChE) e receptores de insulina (IRS-1). Esses resultados sugerem que a atividade neuroprotetora do ACG e da CAF estão relacionados à atividade antioxidante, anti-inflamatória e de manutenção na integridade neuronal, ressaltando seu potencial terapêutico ou adjuvante para o tratamento da DAE.

Palavras chave: Memória. Neuroproteção. Antioxidantes. Hipocampo. Córtex Pré-Frontal.

ABSTRACT

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF CHLOROGENIC ACID AND CAFFEINE IN AN ANIMAL MODEL OF SPORADIC ALZHEIMER'S DISEASE INDUCED BY STREPTOZOTOCIN

Alzheimer's Disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease characterized by the formation of amyloid plaques and intracellular neurofibrillary tangles in cortical areas, leading to progressive memory loss and cognitive impairments, and it is the most common form of dementia. Intracerebroventricular injections of streptozotocin (ICV-STZ) have been used as an experimental model of sporadic AD (SAD) in rodents due to their ability to impair brain insulin signaling, induce oxidative stress, neuroinflammation, and dysfunctions in neurogenesis, as well as cognitive decline, which are characteristic features of SAD. Chlorogenic Acid (CGA) and Caffeine (CAF), the main compounds found in coffee, have properties such as glucose metabolism modulation, antioxidant and anti-inflammatory effects, which have already been described. The objective of this study was to investigate the effects of CGA and CAF on cognitive deficits, neuronal damage, and neuroinflammation in mice subjected to the experimental model of ICV-STZ-induced SAD. Male Swiss mice (25-35 g) received bilateral ICV-STZ (3 mg/kg, 1.5 μ l) on days 1 and 3 of the experiment. Treatment with CGA (5 mg/kg, orally) and CAF (15 mg/kg, orally) or vehicle (water, orally) was administered for 26 days, starting 2 hours after the second induction procedure. Blood glucose levels of the animals were measured before and after the induction of SAD. The results demonstrated that there were no significant alterations in blood glucose levels. ICV-STZ caused deficits in aversive, recognition, and spatial memory. Treatment with CGA and CAF protected against deficits in aversive, recognition, and spatial memory. Locomotor activity, working memory, and anxiety-related parameters were not altered. ICV-STZ resulted in increased concentrations of nitrite/nitrate and MDA. Treatment with CGA and CAF protected against the increase in nitrite/nitrate and MDA concentrations in the cortex and hippocampus. Treatment with CGA and CAF protected against increased concentrations of nitrite/nitrate and MDA in the cortex and hippocampus. ICV-STZ caused a decrease in viable neurons, BDNF depletion and astrogliosis and microgliosis in the cortex and hippocampus. Treatment with CGA and CAF protected against decreased viable neurons and BDNF depletion and prevented astrogliosis and microgliosis in the prefrontal cortex and hippocampus. Molecular docking analyses showed that CGA and CAF strongly interact with the acetylcholinesterase (AChE) and insulin receptors (IRS-1). These results suggest that the neuroprotective activity of CGA and CAF is related to their antioxidant, anti-inflammatory, and neuronal integrity maintenance properties, highlighting their therapeutic or adjuvant potential for the treatment of SAD.

Keywords: Memory. Neuroprotection. Antioxidants. Hippocampus. Prefrontal Cortex.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Principais sinais, sintomas e estágios característicos da doença da DA.....	26
Figura 2- Alterações do cérebro na Doença de Alzheimer.....	28
Figura 3 - Disfunção mitocondrial na DA.....	33
Figura 4 - Ativação da Micróglia e Resolução da Inflamação	36
Figura 5 - Esquema do Metabolismo da APP	43
Figura 6 - Estruturas químicas da estreptozotocina e glicose.....	51
Figura 7 - Diagrama representando o efeito da estreptozotocina (STZ) no estresse oxidativo, morte celular apoptótica e neuroinflamação.....	52
Figura 8 - Provável mecanismo de neurotoxicidade induzida pela STZ e a patologia DA.....	53
Figura 9 - Estrutura química do ácido clorogênico	57
Figura 10 - Estrutura química da cafeína.....	58
Figura 11 - Esquema das seções de micro injeções.....	66
Figura 12 - Desenho experimental mostrando a sequência dos testes comportamentais realizados nos subgrupos de animais.....	69
Figura 13 - Arena do Campo Aberto	70
Figura 14 - Labirinto em Y.....	71
Figura 15 - Ilustração representando a metodologia do teste de reconhecimento de objetos. .	73
Figura 16 - Aparelho de Esquiva Passiva.....	74
Figura 17 - Labirinto aquático com pistas	75
Figura 18 - Labirinto em cruz elevado	76
Figura 19 - Representação do cérebro de camundongo com ilustração esquemática das subdivisões do CPF e do Hipocampo.....	78
Figura 20 - Representação esquemática do princípio geral da técnica de imuno-histoquímica	80
Figura 21 - Efeito do Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) na atividade locomotora de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ no teste do campo aberto.....	83
Figura 22 - Efeito do Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) sobre a memória de trabalho em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.	84
Figura 23 – Efeito do Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) sobre a memória de reconhecimento em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.	85

Figura 24 - Efeito do Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) sobre a memória aversiva recente e tardia em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.	86
Figura 25 - Efeito do Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) sobre a memória espacial em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.	88
Figura 26 - Efeito do Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) sobre ansiedade em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.....	90
Figura 27 - Efeito do tratamento com o Ácido Clorogênico e Cafeína sobre a glicemia em camundongos submetidos ao modelo de DAE por STZ	91
Figura 28 - Efeitos do Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) sobre a concentração de nitrito/nitrato (NO ₂ /NO ₃) no córtex e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.....	92
Figura 29 - Efeito do Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) sobre a peroxidação lipídica (TBARS) no córtex e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.....	93
Figura 30 - Avaliação da viabilidade celular através da coloração com o Cresil violeta no córtex pré-frontal de camundongos tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) após as injeções ICV-STZ.....	95
Figura 31 - Avaliação da viabilidade celular através da coloração com o Cresil violeta no hipocampo nas regiões CA1, CA3 e GD de camundongos tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) após a ICV-STZ.	96
Figura 32 - Avaliação da viabilidade celular através da coloração com o Cresil violeta no córtex pré-frontal de camundongos tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) após as injeções ICV-STZ.....	98
Figura 33 - Avaliação da viabilidade celular através da coloração com o Cresil violeta no hipocampo nas regiões CA1, CA3 e GD de camundongos tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) após as injeções ICV-STZ.....	99
Figura 34 - Avaliação da imunomarcção para BDNF no córtex pré-frontal de camundongos tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) após as injeções ICV-STZ.....	101
Figura 35 - Avaliação da imunomarcção para BDNF no hipocampo nas regiões CA1, CA3 e GD de camundongos tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) após ICV-STZ.....	102
Figura 36 - Avaliação da imunomarcção para BDNF no córtex pré-frontal de camundongos tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) após as injeções ICV-STZ	104

Figura 37 - Avaliação da imunomarcção para BDNF no hipocampo nas regiões CA1, CA3 e GD de camundongos tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) após a ICV-STZ.....	105
Figura 38 - Avaliação da ativação de astrócitos (astrogliose) através da imunomarcção com o GFAP no córtex pré-frontal de camundongos tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) após as injeções ICV-STZ.....	107
Figura 39 - Avaliação da ativação de astrócitos (astrogliose) através da imunomarcção com o GFAP no hipocampo nas regiões CA1, CA3 e GD de camundongos tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) após a ICV-STZ.....	108
Figura 40 - Avaliação da ativação de astrócitos (astrogliose) através da imunomarcção com o GFAP no córtex pré-frontal de camundongos tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) após a ICV-STZ.....	110
Figura 41 -Avaliação da ativação de astrócitos (astrogliose) através da imunomarcção com o GFAP no hipocampo nas regiões CA1, CA3 e GD de camundongos tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) após a ICV-STZ.....	111
Figura 42 - Avaliação da ativação das micróglia, através da imunomarcção com o Iba-1 no córtex pré-frontal de camundongos tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) após a ICV-STZ.....	113
Figura 43 - Avaliação a ativação das micróglia, através da imunomarcção com o Iba-1 no hipocampo nas regiões CA1, CA3 e GD de camundongos tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) após a ICV-STZ.....	114
Figura 44 - Avaliação da ativação das micróglia, através da imunomarcção com o Iba-1 no córtex pré-frontal de camundongos tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) após a ICV-STZ.....	116
Figura 45 - Avaliação da ativação das micróglia, através da imunomarcção com o Iba-1 no hipocampo nas regiões CA1, CA3 e GD de camundongos tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) após a ICV-STZ.....	117
Figura 46 - Representação gráfica (média \pm desvio padrão) das energias de ligação (em kcal/mol) do docking molecular entre Cafeína, Ácido Clorogênico, alvos Acetilcolinesterase (AChE) e Receptor de Insulina tipo 1 (IRS1) calculados pelo software AutoDock Vina.	119
Figura 47 - Representação tridimensional da interação entre (A) Ácido Clorogênico, (B) Cafeína, com a enzima AChE; e interação entre (C) Ácido Clorogênico e (D) cafeína com o IRS-1. Ilustração da interação do ligplot em 2D mostra todos os aminoácidos.....	120
Figura 48 - Fluxograma com a relação dos achados do presente trabalho.....	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sítios das micro injeções bilaterais de STZ nos ventrículos laterais	66
Tabela 2 - Protocolo experimental	68
Tabela 3 - O efeito do tratamento com o Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) na distância percorrida, velocidade média e no número de <i>crossings</i> e <i>rearings</i> , registrados por meio do software <i>ANY-maze</i> (versão 4, USA), em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ no teste do campo aberto.....	82
Tabela 4 - Resumo dos efeitos do ACG e Cafeína nos diferentes testes realizados nesse estudo	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4HNE	- 4-hidroxi-2-trans-nonenal
ACG	- Ácido Clorogênico
ACh	- Acetilcolina
AchE	- Acetilcolinesterase
aCSF	- Fluido espinhal cerebral artificial
ADI	- <i>Alzheimer's Disease International</i>
Akt	- Proteína serina/treonina quinase
AlCl ₃	- Cloreto de alumínio
AMPc	- Adenosina Monofosfato Cíclica
ANOVA	- <i>Analysys of Variance</i> (Análise de Variância)
ApoE	- Apolipoproteína E
APP	- Proteína Precursora Amiloide
ATP	- Adenosina trifosfato
A β	- Peptídeo β amiloide
BACE1	- Enzima β -secretase 1
BAX	- Proteína associada a bcl-2
BCL-2	- Linfoma de células B 2
BDNF	- Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
mBDNF	- BDNF maduro
BChE	- Butirilcolinesterase
BHE	- Barreira Hematoencefálica
CA1	- Corno de Amon 1
CA2	- Corno de Amon 2
CA3	- Corno de Amon 3
CAF	- Cafeína
CDR	- <i>Clinical Dementia Rating</i>
CEUA	- Comissão de Ética no Uso de Animais

ChAT	-	Colina-acetiltransferase
CONCEA	-	Conselho Nacional de controle de Experimentação Animal
COX-2	-	Ciclooxigenase-2
CPF	-	Córtex Pré-Frontal
CREB	-	Proteína de ligação responsiva ao AMPc
DA	-	Doença de Alzheimer
DAE	-	Doença de Alzheimer Esporádica
DAF	-	Doença de Alzheimer Familiar
DFT	-	Teoria Funcional da Densidade
DM	-	Diabetes Mellitus
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico
EDI	-	Enzima de Degradação da Insulina
ENF	-	Emaranhados Neurofibrilares
EROS	-	Espécies Reativas de Oxigênio
GABA	-	Ácido Gama Aminobutiírico
GD	-	Giro Denteado
GFAP	-	Proteína Ácida Fibrilar Glial
GLUT	-	Transportadores de Glicose Independentes de Sódio
GPx	-	Glutationa Peroxidase
GR	-	Glutationa Redutase
GSH	-	Glutationa Reduzida
GSK-3	-	Enzima Glicogênio Sintase Cinase 3
H ₂ O ₂	-	Peróxido de Hidrogênio
i.p.	-	Injeção Intraperitoneal
ICV	-	Intracerebroventricular
ICV-STZ	-	Injeções intracerebroventricular de STZ
IFN- γ	-	Interferon-gama
IGF-1	-	Fatores de Crescimento Semelhantes à Insulina-1
IL	-	Interleucinas

iNOS	- Óxido Nítrico Sintase Induzível
LCE	- Labirinto em Cruz Elevado
LCR	- Líquido Cefalorraquidiano
LDL	- Lipoproteína de Baixa Densidade
LTD	- Depressão de Longa Duração
LTP	- Potenciação de Longa Duração
MAPK	- Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
MCP-1	- Proteína Quimioatrativa de Monócitos 1
MDA	- Malondialdeído
MMSE	- <i>Mini-Mental State Examination</i>
NEP	- Neprilisina
NF-κB	- Fator Nuclear Kappa B
NO	- Óxido Nítrico
NPDM	- Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
O ₂	- Oxigênio Molecular
OH	- Radical Hidroxila
OMS	- Organização Mundial de Saúde
P13K	- Enzima Fosfatidilinositol-3 Cinase
p75NTR	- Receptor pan-neurotrofina
PBS	- Tampão Fosfato-salino
PDEs	- Inibidor Competitivo Não Seletivo de Fosfodiesterases
PGE ₂	- Prostaglandina E ₂
PKB	- Proteína Cinase B
PN	- Placas Neuríticas
PS1	- Presenilinas 1
PS2	- Presenilinas 2
IR	- Receptor de Insulina
sAPP α	- Proteína Precursora de α -amiloide Secretada
SGLT	- Transportadores de Glicose Dependentes de Sódio

SNC	- Sistema Nervoso Central
SOD	- Superóxido Dismutase
STZ	- Estreptozotocina
TAU	- proteína TAU
TBARS	- Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TLR4	- Receptor Toll-like 4
TNF- α	- Fator de Necrose Tumoral-alfa
TrkB	- Receptor de Tropomiosina Quinase B
UFC	- Universidade Federal do Ceará
v.o.	- via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1. 1 A Doença de Alzheimer	21
<i>1. 1. 1 Definição da Doença</i>	<i>21</i>
<i>1. 1. 2 Epidemiologia</i>	<i>22</i>
<i>1. 1. 3 Classificação</i>	<i>24</i>
<i>1. 1. 4 Progressão e Sintomas da DA</i>	<i>24</i>
<i>1. 1. 5 Fatores de Risco</i>	<i>27</i>
<i>1. 1. 6 Fisiopatologia</i>	<i>28</i>
1. 2 Estresse Oxidativo na DA	31
1. 3 Inflamação na DA	34
1. 4 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) na DA	37
1. 5 Memória na DA	39
1. 6 Hipóteses sobre a etiopatologia da DA	42
<i>1. 6. 1 Cascata Amiloide</i>	<i>42</i>
<i>1. 6. 2 Metabolismo da glicose no cérebro</i>	<i>44</i>
1. 7 Resistência à insulina no SNC na DA	46
1. 8 Diagnóstico e tratamento da DA	47
1. 9 Simulações de Ancoragem Molecular (Docking Molecular) na DA	49
1. 10 Modelo experimental de DAE induzida por ICV-STZ	50
2 PERGUNTA NORTEADORA	62
3 HIPÓTESES	62
4 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	63
5 OBJETIVOS	64
5. 1 Objetivo Geral	64
5. 2 Objetivos Específicos	64
6 MATERIAIS E MÉTODOS	65
6. 1 Animais	65
6. 2 Drogas	65
6. 3 Modelo de Doença de Alzheimer Esporádica (DAE) induzido por Estreptozotocina (STZ)	65
6. 4 Protocolo Experimental	67
6. 5 Dosagem da glicemia	69

6. 6 Testes comportamentais.....	69
6. 6. 1 Avaliação da Atividade Locomotora - Teste do Campo Aberto	70
6. 6. 2 Avaliação sobre a Memória.....	71
6. 6. 2. 1 Avaliação da memória de trabalho - Teste Labirinto em Y (Y-maze)	71
6. 6. 2. 2 Avaliação da memória de reconhecimento – Teste do Reconhecimento de Objetos	72
6. 6. 2. 3 Avaliação da Memória Aversiva – Teste da Esquiva Passiva.....	73
6. 6. 2. 4 Avaliação da memória espacial - Teste do Labirinto Aquático	74
6. 6. 2. 5 Avaliação da ansiedade - Labirinto em cruz elevado	75
6. 7 Avaliações bioquímicas - Estresse Oxidativo	76
6. 7. 1 Determinação da peroxidação lipídica	76
6. 7. 2 Determinação da concentração de nitrito/nitrato	77
6. 8 Análise histoquímica	77
6. 8. 1 Avaliação da viabilidade celular através do Violeta de Cresil.....	78
6. 8. 2 Imunohistoquímicas para BDNF, GFAP e Iba-1	79
6. 9 Docking Molecular	80
6. 10 Análise Estatística.....	81
7 RESULTADOS	82
7. 1 Efeitos do Ácido Clorogênico e Cafeína sobre a atividade locomotora (Teste do Campo aberto) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.	82
Fonte: dados da pesquisa	82
7. 2 Efeitos do Ácido Clorogênico e Cafeína sobre o déficit na memória de trabalho (Teste do Labirinto em Y) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.....	84
7. 3 Efeitos do Ácido Clorogênico e Cafeína sobre o déficit na memória de reconhecimento (Teste de Reconhecimento de Objetos) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.	85
7. 4 Efeitos do Ácido Clorogênico e Cafeína sobre a memória aversiva (Teste da Esquiva Passiva) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.	86
7. 5 Efeitos do Ácido Clorogênico e Cafeína sobre o déficit na memória espacial (Teste do Labirinto Aquático) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.	87
7. 6 Efeitos do Ácido Clorogênico e Cafeína sobre a ansiedade em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.....	89

7. 7 Níveis de glicose no sangue periférico em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.	90
7. 8 Efeitos Ácido Clorogênico e Cafeína sobre a dosagem de nitrito/nitrato (ON ₂ /ON ₃) em tecidos cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ. ...	91
7. 9 Efeitos do Ácido Clorogênico e Cafeína sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em tecidos cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.....	93
7. 10 Efeitos do Ácido Clorogênico 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 ICV-STZ.....	94
7. 11 Efeitos da Cafeína 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 ICV-STZ.	97
7. 12 Efeitos do Ácido Clorogênico sobre o fator de crescimento celular através da imunomarcção com o BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.....	100
7. 13 Efeitos da Cafeína sobre o fator de crescimento celular através da imunomarcção com o BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.	103
7. 14 Efeitos do Ácido Clorogênico sobre a ativação de astrócitos através da imunomarcção com o GFAP no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.....	106
7. 15 Efeitos da Cafeína sobre a ativação de astrócitos através da imunomarcção com o GFAP no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.	109
7. 16 Efeitos do Ácido Clorogênico sobre a ativação das micróglia através da imunomarcção com o Iba-1 no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.....	112
7. 17 Efeitos da Cafeína sobre a ativação das micróglia através da imunomarcção com o Iba-1 no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.	115
7. 18 Estudo das interações do Ácido Clorogênico e Cafeína com a AChE e IRS-1 usando o Docking Molecular	118
8 DISCUSSÃO	121
9 CONCLUSÃO.....	147

10 LIMITAÇÕES DA PESQUISA	148
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	149
ANEXO.....	198

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Descoberta da Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) designada em 1910 por Emil Kraepelin (GOEDERT; SPILLANTINI, 2006; HIPPIUS; NEUNDÖRFER, 2022), recebeu este nome em homenagem ao psiquiatra alemão Alois Alzheimer que, em 3 de Novembro de 1906, apresentou-a pela primeira vez na 37ª reunião da Sociedade de Psiquiatras Alemães do Sudeste, em *Tübingen*, os resultados de suas análises morfológicas e histopatológicas da autópsia cerebral do caso da sua paciente Auguste Deter, uma mulher saudável que, aos 50 anos, foi acometida de uma doença mental incomum, desenvolvendo um quadro de perda progressiva de memória e alterações de comportamento, sendo institucionalizada no Hospital Psiquiátrico de Comunidade de *Frankfurt am Main* (FERRI *et al.*, 2017; GOEDERT; SPILLANTINI, 2006; HIPPIUS; NEUNDÖRFER, 2022). Após o óbito de sua paciente, aos 55 anos, ele notou que o seu tecido encefálico exibia uma considerável redução de células e descreveu as mudanças histológicas distintivas da condição: placas senis e emaranhados neurofibrilares (ENF) que se transformaram nos marcadores patológicos da DA (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2010).

Recebendo pouca atenção inicialmente, as descobertas de Alois Alzheimer somente foram amplamente reconhecidas após sua inclusão no famoso livro *Psychiatrie*, de Kraepelin, publicado em 1910, introduzindo o termo diagnóstico da DA (HIPPIUS; NEUNDÖRFER, 2022).

1.1.1. Definição da Doença

O termo “Doença de Alzheimer”, como definido pela Associação de Alzheimer do Instituto Nacional do Envelhecimento dos EUA (NIA-AA), se refere a uma síndrome de distúrbios neuropatológicos, que não deve ser definido por sintomas clínicos, e sim por biomarcadores, em pacientes vivos, ou por exame pós-morte (JACK *et al.*, 2018). Devido à baixa confiabilidade de diagnósticos clínicos baseados no fenótipo de demência amnésica multidomínio, foi historicamente utilizado o termo “Síndrome Clínica de Alzheimer”, que é recomendado para diagnósticos baseados em sintomas clínicos (JACK *et al.*, 2018; DEB *et al.*, 2017).

Anormalidades de biomarcadores de deposição do peptídeo β Amiloide ($A\beta$) são os primeiros a serem encontrados durante a patogênese de DA, e, juntamente com os

biomarcadores que indicam a presença de depósitos de filamentos pareados helicoidais de Tau, são necessários para satisfazer os critérios neuropatológicos de DA, e, portanto, devem ocorrer para o diagnóstico de DA. Caso os biomarcadores evidenciem somente a presença de deposição de A β , o termo “Alteração Patológica de Alzheimer” é indicado (JACK *et al.*, 2018).

1. 1. 2 Epidemiologia

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva crônica relacionada ao envelhecimento, que resulta em neurodegeneração. Ela se manifesta por meio da perda gradual de memória e déficits cognitivos progressivos, impactando significativamente as habilidades necessárias para as atividades cotidianas (VILLEMAGNE *et al.*, 2017; QIU *et al.*, 2022). Entre os idosos, é a forma mais comum de demência, constituindo aproximadamente 60 a 70% de todos os casos (SRIVASTAVA *et al.*, 2021; NICHOLS *et al.*, 2022).

O aumento da longevidade da população global tem ocasionado um efeito substancial na saúde humana, conduzindo ao crescimento da quantidade de pessoas que atingem a faixa etária em que as doenças neurodegenerativas se tornam frequentes (SELKOE, 2001; PAL; TYLER, 2016; QIU *et al.*, 2022). De acordo com a *Alzheimer’s Disease International* (ADI), estima-se que mais de 48,6 milhões de pessoas são afetadas pela DA no mundo e esse número irá dobrar em 20 anos, com registro de 9,9 milhões de novos casos de demência a cada ano (ADI, 2015; LANGA *et al.*, 2017; LAO, 2022). 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; LAO, 2022; OMS, 2021). As limitações nas capacidades cognitivas, abrangendo a memória, são as constatações mais frequentes ao longo do processo de envelhecimento e quando combinadas com outras disfunções cognitivas, podem indicar um quadro de demência (SHIVARAMA SHETTY; SAJIKUMAR, 2017).

Segundo a Associação Brasileira de Alzheimer (2020), no Brasil estima-se uma prevalência de 1,5 milhões de pessoas com diagnóstico de demência. César-Freitas e colaboradores (2022) 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, demonstrou-se 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.

Outros estudos mostraram que as mulheres correspondiam a 65% dos casos de DA no Brasil (SCHELTENS *et al.*, 2021; ARAUJO, 2023). Nesse estudo, também foi observado que a faixa etária que apresentou maior quantidade de admissões hospitalares foi entre 80 anos ou mais, seguida por 70 a 79 anos, 60 a 69 anos, 50 a 59 anos e 40 a 49 anos. A faixa etária de 70 a 79 anos e de 80 anos ou mais representaram juntas 87,2% dos casos de DA no período entre 2013 e 2022 no Brasil (ARAUJO, 2023). 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).

De acordo com as informações epidemiológicas, a demência é amplamente reconhecida como um desafio médico, social e econômico de grande magnitude tanto em nações desenvolvidas quanto em países em desenvolvimento (BREITNER *et al.*, 2009; ZILKENS *et al.*, 2009). 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 (ADI, 2022). Essa elevação da ocorrência de demência não está restrita apenas aos países de alta capacidade econômica; na realidade, a maioria das pessoas afetadas pela demência reside em nações de renda média ou baixa, onde o enfrentamento dos desafios advindos do envelhecimento populacional se tornou uma questão social e econômica (FERRI; JACOB, 2017).

Os impactos da DA no indivíduo são severos, reduzindo a expectativa de vida de pacientes e constituindo um dos principais motivos de deficiências físicas, institucionalizações e qualidade de vida impactada em idosos (QIU *et al.*, 2022). A expectativa de vida de pacientes com DA após seu diagnóstico era de 5 a 8 anos (FÖRSTL; KURZ, 1999) e tem aumentado para 9 anos, em média, em pacientes diagnosticados aos 65 anos (CASTRO *et al.*, 2010). O cuidado requerido por pacientes de demências impõe consideráveis fardos psicológicos, práticos e econômicos aos familiares (FERRI *et al.*, 2005).

1. 1. 3 Classificação

A DA é uma doença multifacetada e com múltiplas possíveis etiologias (QIU *et al.*, 2022). A DA pode se apresentar de duas maneiras, a Doença de Alzheimer Familiar (DAF), e a Doença de Alzheimer Esporádica (DAE). A DAF possui início precoce, ocorre geralmente antes dos 65 anos, e está relacionada com mutações em diversos genes, tais como o gene codificador da proteína precursora amiloide (APP), da presenilina 1 (PS1) e presenilina 2 (PS2) (SHU; CHECLER, 2002; FRIDMAN *et al.*, 2004; PHILIPSON *et al.*, 2010; XIE *et al.*, 2013; SHEPPARD; COLEMAN, 2020). Sua progressão é mais acelerada e é caracterizada pela perda de memória, mudanças comportamentais, déficits de julgamento e de fluência verbal, tendo um grande impacto no ambiente familiar (HEGER, 2014).

A DAE, que é responsável por aproximadamente 95% dos casos de DA (MISHRA *et al.*, 2018; GAO *et al.*, 2021), é a principal causa de demência em todo o mundo, onde o maior fator de risco é o envelhecimento, no qual sintomas ocorrem a partir dos 65 anos de idade e não estão relacionados às mutações observadas na DAF, mas há indícios de relação com proteína apolipoproteína E (ApoE), sendo um possível fator de risco (XIE *et al.*, 2013; BEKRIS *et al.*, 2010; REITZ *et al.*, 2011; SHEPPARD; COLEMAN, 2020).

A clinicopatologia dos tipos de DA também difere, com sinais e sintomas atípicos mais frequentes na DA familiar do que na esporádica (SHINOHARA *et al.*, 2014; GAO *et al.*, 2021). Características fisiopatológicas também diferem: DAE apresenta acumulação desproporcionada de A β em áreas corticais quando comparada à DAF, que por sua vez possui maior acumulação em áreas subcorticais (SHINOHARA *et al.*, 2014).

1. 1. 4 Progressão e Sintomas da DA

Em relação à sua progressão, a DA é caracterizada por um declínio crônico e progressivo de habilidades cognitivas e neurocomportamentais, principalmente em relação à memória, é primeiro detectado após um longo período assintomático, que acredita ser de 20 a 30 anos (GOEDERT; SPILLANTINI, 2006; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013; WIRZ *et al.*, 2014; GAO *et al.*, 2021). Os sintomas da DA resultam de múltiplos fatores etiológicos, incluindo fatores ambientais, genéticos e metabólicos, dentre esses, a redução do metabolismo de glicose e utilização de energia, observados nos estágios iniciais da doença (CHEN *et al.*, 2013). A memória, raciocínio, orientação, compreensão, capacidade de aprendizagem, linguagem e julgamento são todos afetados. Além de mudanças no humor, controle

emocional, comportamento ou motivação são frequentemente associados e ocasionalmente precedem o comprometimento cognitivo (WHO, 2021; CHEN *et al.*, 2013).

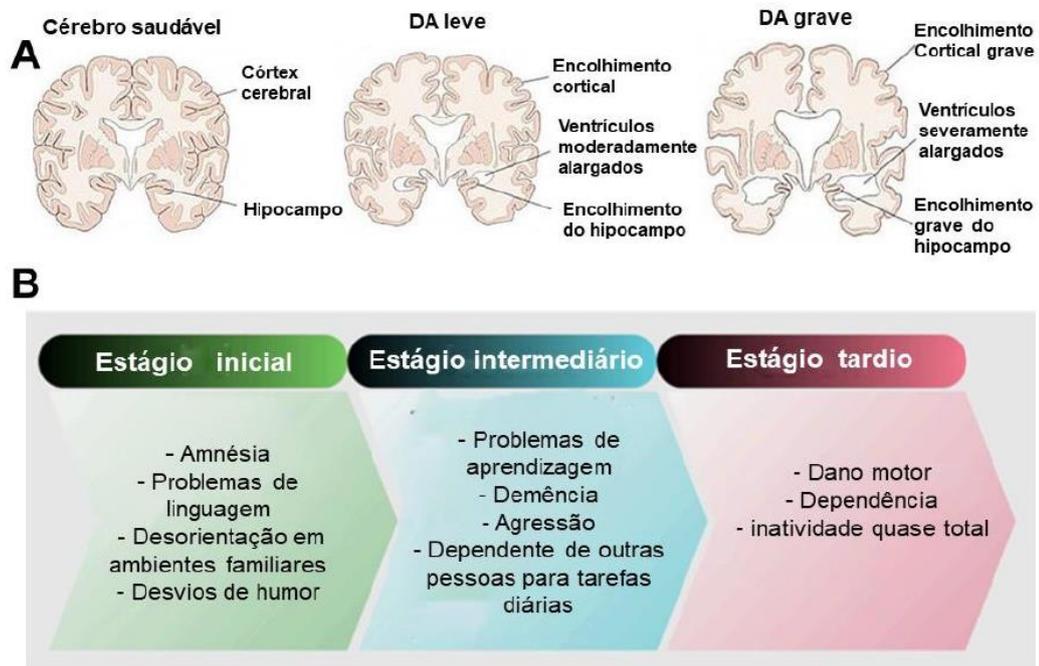
A fase clínica inicial é comumente denominada Comprometimento Cognitivo Leve Amnésico (CCLA) (GOEDERT; SPILLANTINI, 2006; WIRZ *et al.*, 2014). Alterações comportamentais não cognitivas, como isolamento social e disforia depressiva, podem ocorrer anos antes do diagnóstico da doença (JACK *et al.*, 2018).

Durante os primeiros estágios, a DA é predominantemente marcada pela deterioração gradual da função cognitiva, levando a um progressivo declínio da memória que se manifesta como dificuldade de aprendizado e evocação de informações recentemente adquiridas (VILLEMAGNE *et al.*, 2017). Esse sintoma se desenvolve de forma sutil e avança gradualmente ao longo do tempo (MCKHANN *et al.*, 2002). Há uma deterioração em outras funções, como a capacidade de concentração, dificuldades na comunicação verbal e nas habilidades motoras, bem como a manifestação de sintomas depressivos ou outras alterações neurocomportamentais, como mudanças nos padrões de sono. Tais mudanças afetam o desempenho em atividades ocupacionais e sociais (KAR *et al.*, 2004; REITZ *et al.*, 2011; JACK *et al.*, 2018; GAO *et al.*, 2021) (Figura 1).

Com o progresso da doença, os distúrbios da memória, dificuldades linguísticas, e deficiências cognitivas se tornam mais severas, os quais incluem dificuldades de identificação, fluência, compreensão e associação das palavras, podendo levar a afasia, bem como ações do dia-a-dia que são sequências ideomotoras de ações (capacidade de realizar um movimento ou gesto simples de maneira intencionada) se tornam progressivamente mais desorganizadas, até o indivíduo não conseguir mais realizá-las (FÖRSTL; KURZ, 1999; JACK *et al.*, 2018) (Figura 1).

A desorientação espacial se torna mais agravada, levando a uma desorganização no controle motor (apraxia), não reconhecimento de objetos e/ou familiares (agnosia visual cortical), alucinações visuais se tornam presentes (JACK *et al.*, 2018). Falta de consciência da própria doença (anosognosia) e forte inquietação se tornam presentes. Além disso, há a perda de controle emocional, que pode vir em conjunto com maior agressividade física ou verbal (FÖRSTL; KURZ, 1999; HELMES; OSTBYE, 2002; FAIYAZ *et al.*, 2021) (Figura 1).

Figura 1 - Principais sinais, sintomas e estágios característicos da DA



Fonte: (Adaptado de FAIYAZ *et al.*, 2021).

Na imagem (A), na DA leve, observa-se 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. Na imagem (B) sintomas típicos associados aos estágios da doença (inicial, intermediário e tardio).

A deterioração da memória dificulta a conexão das pessoas com DA em seus relacionamentos afetivos, sociais e familiares (LOPEZ *et al.*, 2019). Com a incapacidade de recordar eventos, lugares e indivíduos, é possível observar que a essência da pessoa afetada pela DA é gradualmente diminuída, tornando-se incapaz de se engajar em relacionamentos, cuidar de si mesma, planejar sua qualidade de vida e, simultaneamente, perdendo sua lucidez, autonomia e coesão (KAR *et al.*, 2004).

Sinais como a deterioração gradual das capacidades cognitivas e emocionais, alterações comportamentais, prejuízos no julgamento e na fluência verbal, aumentam em frequência e intensidade à medida que a doença progride, exercendo um impacto significativo no ambiente familiar devido à exigência de cuidados constantes ao paciente (CITRON, 2002; RODRIGUEZ *et al.*, 2003; BLESÁ, 2004). A capacidade comunicativa é quase completamente perdida, e indivíduos se tornam limitados a frases simples ou mesmo somente palavras (FÖRSTL; KURZ, 1999).

A maioria dos pacientes ainda possuem receptividade emocional, e sinais de apatia e exaustão são comuns, enquanto inquietação e agressividade podem ser causadas por dor ou

pelas consequências de um ciclo circadiano desregulado (FÖRSTL; KURZ, 1999; GAO *et al.*, 2021). Os pacientes podem precisar de ajuda para efetuar mesmo as funções motoras mais básicas, como mastigação; incontinência dupla é comum (CEREJEIRA *et al.*, 2012). Pneumonia seguida por infarto no miocárdio e septicemia são as principais causas de morte em pacientes com DA (FÖRSTL; KURZ, 1999; GAO *et al.*, 2021).

Além disso, a DA pode apresentar sintomas comportamentais e psicológicos, tais como agitação, comportamento motor anormal, ansiedade, depressão e alucinações. Estima-se que cerca de 90% dos indivíduos com demência vivenciam esses sintomas, os quais têm um impacto significativo na qualidade de vida tanto dos pacientes com DA quanto de seus cuidadores (CEREJEIRA *et al.*, 2012).

1. 1. 5 Fatores de Risco

Dentre os principais fatores de risco correlacionados com a ocorrência da DA, encontram-se a idade e a predisposição genética (ZHAGN; LI, 2014; SHEPPARD; COLEMAN, 2020). Também foram identificados como elementos correlacionados à DA a presença de hiperlipidemia, hipertensão, indicadores vasculares e metabólicos, bem como o hábito de fumar tabaco (BIESSELS; KAPPELLE, 2005; SHEPPARD; COLEMAN, 2020). É essencial destacar que o manejo desses elementos de risco vascular ou a sua diminuição por meio de alterações no estilo de vida, pode diminuir a probabilidade de desenvolver DA (LIVINGSTON *et al.*, 2017; SETO *et al.*, 2021; BARANOWSKI *et al.*, 2020).

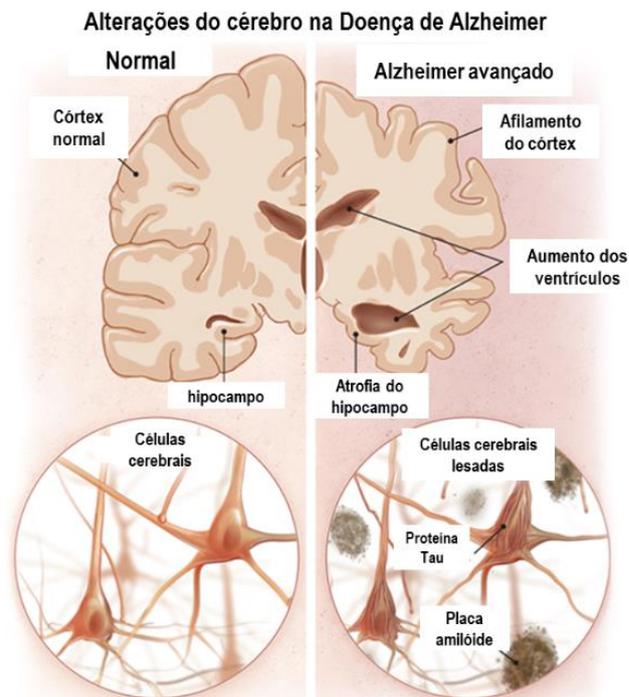
Diversas pesquisas epidemiológicas têm apresentado provas concretas de que o Diabetes Mellitus (DM) tipo 2 é um importante fator de risco para o desenvolvimento da DA (SATO *et al.*, 2011; TAKEDA *et al.*, 2011; OHARA *et al.*, 2011) e evidências indicam que a resistência à insulina tem sido reconhecida como desempenhando um papel significativo na fisiopatologia da DAE (BOSCO *et al.*, 2011; BARANOWSKI *et al.*, 2020; SĘDZIKOWSKA; SZABLEWSKI, 2021).

Entre os elementos que oferecem proteção, incluem-se a adesão à dieta mediterrânea, a prática de atividade física regular, níveis mais elevados de escolaridade, o consumo adequado de ácido fólico, já que a sua deficiência está envolvida ao dano do envelhecimento acelerado do cérebro, e a moderação no consumo de álcool (MARTHA *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2021). Essa interação entre esses fatores protetores e a DA ocorre por mecanismos moleculares ainda desconhecidos (SCARMEAS *et al.*, 2009; DAVIGLUS *et al.*, 2011; ZEISEL *et al.*, 2020).

1. 1. 6 Fisiopatologia

A patologia da DA constitui um quadro complexo envolvendo a combinação de fatores genéticos, moleculares e ambientais (LIVINGSTON *et al.*, 2017; ZEISEL *et al.*, 2020). A neurodegeneração ocorre em múltiplas regiões do cérebro, predominantemente no hipocampo, córtex, amígdala, neocórtex, várias áreas subcorticais, rafe dorsal e *locus ceruleus*, levando a uma perda progressiva de neurônios e sinapses (Figura 2) (KAR *et al.*, 2004; DETURE; DICKSON, 2019; LIVINGSTON *et al.*, 2017; JACK *et al.*, 2018; GAO *et al.*, 2021).

Figura 2- Alterações do cérebro na Doença de Alzheimer



Fonte: (adaptado de JIN, 2015).

Do ponto de vista histopatológico, a DA é caracterizada por um considerável declínio de neurônios, juntamente com a presença de estruturas conhecidas como placas neuríticas (PN) ou *senis*, que consistem no acúmulo extracelular do peptídeo A β . Além disso, são observados emaranhados neurofibrilares intracelulares (ENFs) no cérebro, bem como níveis aumentados de A β , principalmente A β 40 e A β 42 (Figura 2) (DAVIGLUS *et al.*, 2011; SELKOE; HARDY, 2016; WIRZ *et al.*, 2014; JACK *et al.*, 2018; SHEPPARD; COLEMAN, 2020).

Os ENFs surgem devido à degeneração do citoesqueleto dos neurônios, resultado da hiperfosforilação e deposição anormal da proteína Tau, que normalmente está associada aos microtúbulos, e consequente perda neuronal progressiva, levando à diminuição da massa encefálica (ALLARD *et al.*, 2012; IQBAL *et al.*, 2016; CALIGNON *et al.*, 2012; JACK *et al.*, 2018; KNOPMAN *et al.*, 2021).

As PNs são acumulações extracelulares constituídas de estruturas amiloides, peptídeo A β , que são filamentos proteicos de aproximadamente 10 nm de diâmetro com uma estrutura cross- β (estrutura em zigue-zague, em que os aminoácidos de um segmento estão presos por pontes de hidrogênio) e ENFs possuem estrutura de hélice pareada, e ocorrem nos corpos celulares de nervos, em neuritos de neurópilos (tecido entre os corpos celulares de neurônios) e na periferia de PNs (GOEDERT; SPILLANTINI, 2006; JACK *et al.*, 2018; BERLANGA-ACOSTA *et al.*, 2020).

O peptídeo A β constitui um grupo de peptídeos que possuem de 37 a 49 aminoácidos, sendo os de 40 e 42 resíduos os principais. Dentre eles, a forma de 42 resíduos é a mais amiloidogênica (GOEDERT; SPILLANTINI, 2006; CHEN *et al.*, 2017). O peptídeo A β provém da clivagem proteolítica da Proteína Precursora de Amiloide (APP), que está mapeada no cromossomo 21 (CHEN *et al.*, 2017). A β solúvel é altamente neurotóxico, e precede a formação de PNs (WIRTZ *et al.*, 2013; GODYN *et al.*, 2016; BERLANGA-ACOSTA *et al.*, 2020).

A proteína Tau possui seis isoformas e participa da formação e estabilização de microtúbulos (GOEDERT; SPILLANTINI, 2006). Suas isoformas são produzidas a partir do mesmo gene por *splicing* alternativo de mRNA e são igualmente divididas em dois grupos baseado na presença de três ou quatro repetições de ligantes a microtúbulos (SHEPPARD; COLEMAN, 2020).

Os ENFs e PNs aparentam formar-se independentemente, com os ENFs formando-se primeiramente na região transentorrinal e posteriormente no hipocampo, amígdala, e então nas áreas neocorticais (GOEDERT; SPILLANTINI, 2006; WIRZ *et al.*, 2013). A formação de PNs começa no neocórtex, nas áreas cerebrais associadas à cognição, aumentando sua distribuição para outras áreas corticais com progressão da doença e aparenta exacerbar a formação de ENFs (SCHACHTER; DAVIS, 2000; FRISONI *et al.*, 2022). Além disso, a distribuição regional de ENFs possui melhor correlação com a severidade de DA do que os acúmulos de A β (GOEDERT; SPILLANTINI, 2006; SHAKIR; DUGGER, 2022).

Pesquisas têm evidenciado que a neurotoxicidade não é causada pelas placas de peptídeo A β encontradas no ambiente extracelular, mas sim pelas formas oligoméricas fibrilares intracelulares do A β , que se formam ao longo do desenvolvimento da doença (GILBERT, 2013; FRISONI *et al.*, 2022). A formação de aglomerados intracelulares dos

oligômeros do peptídeo A β leva a disfunção sináptica e lesão neuronal em regiões corticais cerebrais fundamentais para a memória e outras funções cognitivas (VILLEMAGNE *et al.*, 2017). Acredita-se que essas alterações desempenhem um papel significativo na progressiva neurodegeneração relacionada à DA (SPIRES; JONES; HYMAN, 2014). Além disso, estudos genéticos demonstram que mutações nas presenilinas 1 e 2 (PS1 e PS2) e na APP, localizadas nos cromossomos 14, 1 e 21, respectivamente, estão associadas à forma familiar da Doença de Alzheimer ou à sua manifestação precoce (PUGLIELLI; TANZI; KOVACS, 2003; SHEPPARD; COLEMAN, 2020).

A deposição de A β é característica para DA, mas a acumulação de proteína TAU hiperfosforilada também é observado em outras doenças neurodegenerativas, conhecidas como Tauopatias, as quais englobam a Doença de Pick, degeneração corticobasal, paralisia supranuclear progressiva, além disso, mutações no gene de tau causam demência frontotemporal herdável e parkinsonismo ligado ao cromossomo 17 (GIBBONS *et al.*, 2018; GOEDERT; SPILLANTINI, 2006; DETURE; DICKSON, 2019).

Relacionado a essas características morfológicas específicas, ocorrem uma série de processos que resultam em disfunção neuronal, especialmente nos neurônios colinérgicos, presentes em regiões relacionadas à cognição e à formação de memórias, como o córtex pré-frontal e o hipocampo, juntamente com suas regiões associadas. Esses eventos levam à atrofia dessas áreas devido à morte neuronal e ao declínio cognitivo (GENG; LUO, 2014; DETURE; DICKSON, 2019). Os neurônios remanescentes passam por extensivas mudanças morfológicas, entre elas distrofia neurítica, remodelação das árvores axônicas e da densidade dos espinhos dendríticos (SPIRES; HYMAN, 2005; GOVINDARAJU, 2022).

Outras características da DA incluem perda celular, neuroinflamação e ativação elevada de vias e genes apoptóticos, distúrbios no metabolismo energético, atividade colinérgica reduzida, e estresse oxidativo crônico (STEEN *et al.*, 2005; SAPCANIN *et al.*, 2008; WIRZ *et al.*, 2014; GOVINDARAJU, 2022). Hipometabolismo de glicose e distúrbios na sinalização de insulina são características de cérebros com DA, sendo o primeiro um dos sinais mais iniciais da doença, podendo ser detectado até três décadas antes do aparecimento de sintomas clínicos de DA familiar (WIRZ *et al.*, 2014; GRIEB, 2016; SHAKIR; DUGGER, 2022). Significativamente, o decréscimo do consumo de glicose no cérebro com DA é muito maior do que a redução de consumo de oxigênio, um padrão de desproporcionalidade encontrado em todas as áreas do cérebro (GRIEB, 2016; KOCH; SPAMPINATO, 2022).

Assim, as alterações descritas promovem um cenário de desequilíbrio neuroquímico, caracterizado por evidências de neurodegeneração, neuroinflamação, estresse oxidativo, aumento da sinalização pró-apoptótica, déficit na função colinérgica, disfunção mitocondrial,

comprometimento da transmissão sináptica e desequilíbrio entre diversos neurotransmissores (DETURE; DICKSON, 2019; PRASANNA *et al.*, 2021). Essas alterações afetam a conectividade dos circuitos relacionados à memória e cognição, sendo responsáveis pelos sintomas observados na DA (TERRY *et al.*, 1991; GRIEB, 2016; JACK *et al.*, 2018; KOCH; SPAMPINATO, 2022).

1. 2 Estresse Oxidativo na DA

O estresse oxidativo ocorre quando a geração de agentes oxidantes excede a capacidade dos sistemas antioxidantes, resultando em um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade de defesa celular contra esses agentes (HALLIWELL, 2006b, 2007). Um aumento significativo das espécies reativas de oxigênio (EROs) pode resultar em danos aos lipídios, proteínas e ao ácido desoxirribonucleico (DNA), levando à necrose ou à apoptose (KUSHNAREVA; NEWMeyer, 2010; RUMMEL; BUTTERFIELD, 2022).

De modo geral, o cérebro e os tecidos neurais são mais suscetíveis aos danos oxidativos devido a elementos como o elevado influxo de cálcio nas células nervosas, a presença de neurotransmissores excitatórios, especialmente o glutamato, além da elevada taxa de consumo de oxigênio molecular (O₂) pelos tecidos neurais e a baixa concentração de antioxidantes (REDDY *et al.*, 2020).

É conhecido que ocorre disfunção das mitocôndrias, durante o processo de envelhecimento, o que resulta na produção de EROs. Além disso, são observadas deficiências bioenergéticas, mutações no DNA mitocondrial, mutações genéticas no DNA nuclear e ativação de mecanismos pró-apoptóticos (DAIBER *et al.*, 2015, WU *et al.*, 2015; RUMMEL; BUTTERFIELD, 2022). Ademais, há amplas evidências que indicam que as mitocôndrias desempenham um papel fundamental em doenças neurodegenerativas, devido à sua influência na regulação do processo de morte celular (MICHAEL *et al.*, 2006; ABORODE *et al.*, 2022). De fato, diversos estudos comprovaram o papel crucial da função mitocondrial como um fator essencial na origem da DA, por meio da geração de EROs (ZHAO; ZHAO, 2013; ABORODE *et al.*, 2022). Ademais, diversos estudos têm revelado o incremento da oxidação de lipídios cerebrais e do estresse nitrosativo no cérebro e no plasma de indivíduos diagnosticados com DA (SULTANA *et al.*, 2013; BAI *et al.*, 2022).

Pesquisas têm revelado que o estresse oxidativo e a atividade nitrosativa (NO) exercem um papel prejudicial na origem da DA, resultando em danos a componentes celulares como ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (BUTTERFIELD *et al.*, 2010; REDDY *et al.*, 2020). A atividade nitrosativa surge devido ao acúmulo de macromoléculas

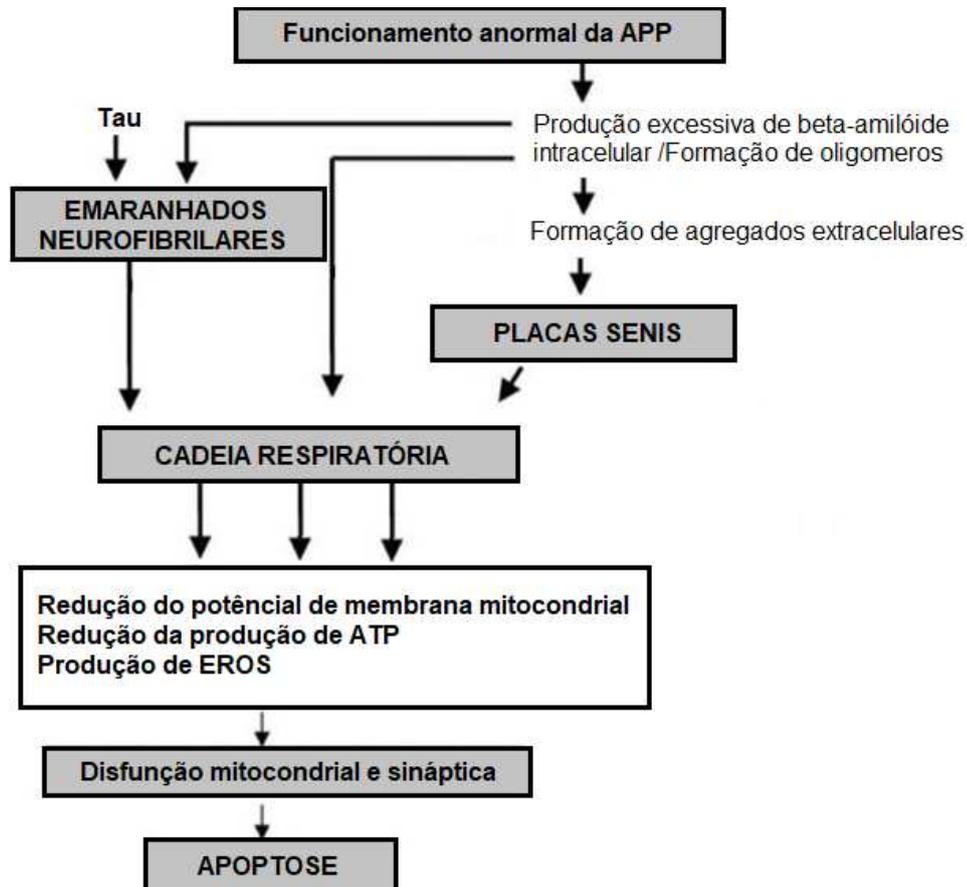
oxidadas/danificadas que não são eficientemente removidas e renovadas. Para contrabalançar a citotoxicidade das ERO's, as células possuem uma variedade de mecanismos de defesa antioxidante, que incluem enzimas protetoras como catalase, superóxido dismutase (SOD), glutatona e glutatona peroxidase (GPx), bem como substâncias que capturam radicais livres, como o ascorbato e a vitamina E (HOWES; HOUGHTON, 2012; LOIZZO *et al.*, 2009; RUMMEL; BUTTERFIELD, 2022).

Uma redução ou a perda de função das enzimas antioxidantes, por diminuição da atividade específica, foi relatada na DA (KIM *et al.*, 2006; BAI *et al.*, 2022). O aumento de estudos clínicos e experimentais indica que o estresse oxidativo pode ter um papel significativo na deterioração dos neurônios em doenças como a DA, esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson e doença de Huntington. Além disso, tratamentos antioxidantes têm demonstrado potencial benefício no contexto das doenças neurodegenerativas (ALIEV *et al.*, 2013; ZHAO; ZHAO, 2013; DEWANJEE *et al.*, 2022).

O estresse oxidativo na DA é evidenciado pela ocorrência de proteínas oxidadas, produtos de glicosilação avançada, peroxidação lipídica e formação de espécies tóxicas, como peróxidos, álcoois, aldeídos, carbonilas e cetonas. Além disso, também ocorrem modificações oxidativas no DNA nuclear e mitocondrial (GELLA *et al.*, 2009; DU *et al.*, 2022).

Na mitocôndria, o A β reduz o potencial de membrana mitocondrial, inibe a cadeia transportadora de elétrons, diminui a taxa respiratória e induz a liberação de espécies reativas, favorecendo a ocorrência de apoptose (ALIEV *et al.*, 2013; RUMMEL; BUTTERFIELD, 2022; DU *et al.*, 2022), que pode ser observado na Figura 3. O A β pode também causar neurotoxicidade por meio da produção direta destas espécies reativas, através da interação com Cu²⁺, Fe²⁺ e Zn²⁺ (FINEFROCK *et al.*, 2003; ALIEV *et al.*, 2011; BAI *et al.*, 2022).

Figura 3 - Disfunção mitocondrial na DA.



Fonte: (Adaptado de GEMELLI, 2013).

APP: precursor da proteína amiloide, EROS: espécies reativas de oxigênio, ATP: adenosina trifosfato, TAU: proteína TAU

A presença de $A\beta$ está intimamente ligada ao dano oxidativo nas membranas lipídicas, resultando em alterações que tornam as membranas mais hidrofílicas. Isso acarreta em modificações na função de transportadores, enzimas e receptores celulares localizados nessas membranas (XIE *et al.*, 2013; DU *et al.*, 2022). Em pacientes com DA, observou-se um aumento na produção 4-hidroxi-2-trans-nonenal (4HNE), um dos principais produtos da oxidação lipídica, ocasionando modificações oxidativas do transportador de glutamato GLT1 e, assim, contribuindo para a neurodegeneração. Além disso, sabe-se que o 4HNE se liga às proteínas glutationa-S-transferase e proteína 1, ocasionando redução da atividade das mesmas (PÉREZ; ARANCIBIA, 2007).

Estresse oxidativo e formação de radicais livres elevados precedem a formação de PNs, porém o dano oxidativo é maior durante as primeiras fases de DA e diminui durante a sua progressão, sugerindo que a doença é associada com alterações compensatórias, como aumento de isoprostanos (um dos marcadores da peroxidação lipídica), que são correlacionados aos níveis de $A\beta$ e Tau no Fluido Cérebro Espinhal (CSF) (WIRZ *et al.*,

2014; DU *et al.*, 2022). Outros estudos, porém, não indicam níveis de estresse oxidativos maiores em fases iniciais de DA, e sugerem que A β indiretamente aumenta a produção de radicais livres ao causar danos à mitocôndria e diretamente ao alterar a atividade oxidorreduutora de vários metais, cujos distúrbios são também associados à doença (WIRZ *et al.*, 2014; DU *et al.*, 2022; DEWANJEE *et al.*, 2022).

O desequilíbrio oxidativo tem sido associado ao avanço da DA, resultando na gradual perda de subpopulações de neurônios específicos e correlacionando-se com a formação de agregados de proteínas. Esses eventos contribuem para a patogênese da doença (XIE *et al.*, 2013). Pesquisas anteriores revelaram que, por meio da atividade das EROs, ocorreu uma modificação na estrutura dos lipídios da membrana, contribuindo para a formação de emaranhados neurofibrilares (ENF) em cérebros de indivíduos com DA (ANSARI; SCHEFF, 2010; CHAUHAN; CHAUHAN, 2006; XIE *et al.*, 2013; DEWANJEE *et al.*, 2022).

1.3 Inflamação na DA

A neuroinflamação é uma marca patológica da DA e precede a formação de placas e emaranhados durante a progressão da DA (ZILKA *et al.*, 2006; KAMAT *et al.*, 2012). Existe uma estreita associação de neuroinflamação com a patogênese da DA que envolve a ativação de células gliais em doenças neurodegenerativas como a DA (MRAK; GRIFFIN, 2001; IFUKU *et al.*, 2012; HAN *et al.*, 2020). No entanto, essas funções gliais anormais às vezes podem resultar em um ciclo neuroinflamatório mais grave e crônico que, na verdade, promove doenças neurodegenerativas (HAN *et al.*, 2020; SINYOR *et al.*, 2020). Componentes inflamatórios relacionados à neuroinflamação da DA incluem células cerebrais, como micróglia e astrócitos (AKIYAMA *et al.*, 2000).

Células da glia fazem parte do Sistema Nervoso e dentre suas diversas funções destacam-se o auxílio no suporte e as ações no funcionamento do sistema nervoso central (HUANG *et al.*, 2015). A micróglia, por exemplo, é a célula glial que desempenha o papel imunomodulador no SNC, são efetoras e reguladoras ativas da homeostase no SNC (HUANG *et al.*, 2015; XIE *et al.*, 2022). As células da micróglia examinam constantemente o ambiente circundante e, como células imunes residentes primárias no SNC, respondem à presença de patógenos, estresse ou lesão (KETTENMANN *et al.*, 2011; ONYANGO *et al.*, 2021). Assim, o chamado fenótipo de repouso também deve refletir um estado ativo e deve ser substituído pelo estado de vigília (HANISCH; KETTENMANN, 2007; HAN *et al.*, 2020).

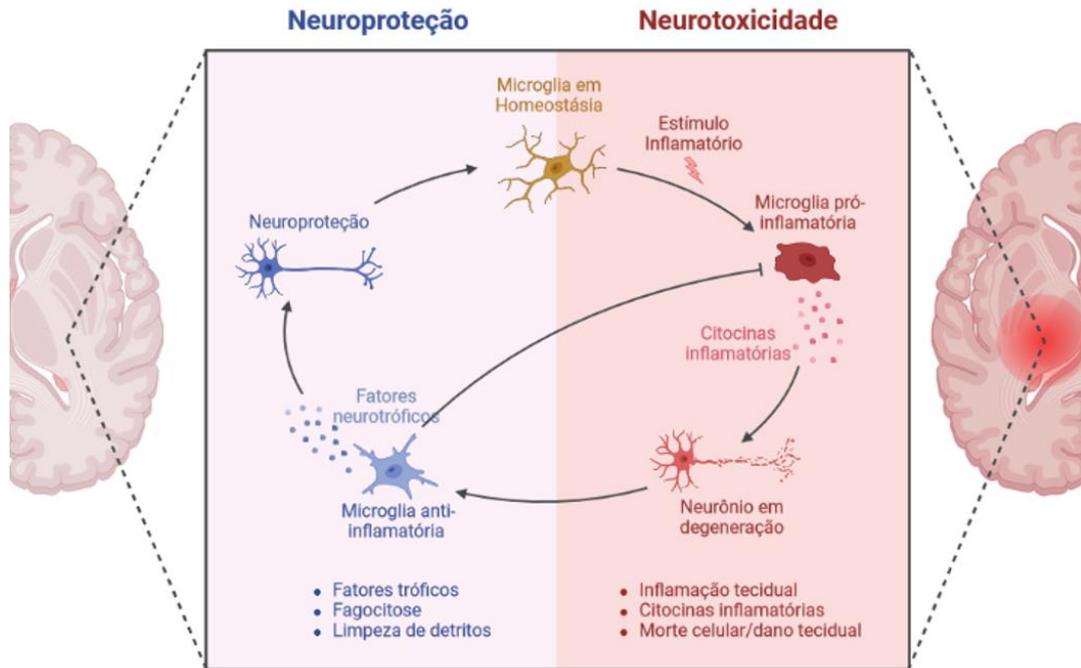
O papel crucial das células micrógliais no SNC não lesado tornou-se mais evidente nos últimos anos, e essas células não apenas estão envolvidas na resposta patológica imune, mas são essenciais durante o desenvolvimento do SNC, participando de processos cruciais, como na poda sináptica (SCHAFER; STEVENS, 2013; HON *et al.*, 2016) e plasticidade sináptica (WU *et al.*, 2015; PAASILA *et al.*, 2022).

Os astrócitos são as células gliais encontradas em maior quantidade no SNC, tendo importância no suporte trófico, metabólico e estrutural dos neurônios (RIZOR *et al.*, 2019). A interação entre os astrócitos e os neurônios em situações fisiológicas é conhecida de longa data (HAN *et al.*, 2020). Quando ocorre alguma lesão no SNC, os astrócitos tornam-se reativos, estado no qual a célula deflagra mecanismos de neuroproteção (RIZOR *et al.*, 2019). A reatividade dos astrócitos é uma característica patológica de várias doenças neurodegenerativas, devido a expressão excessiva de citocinas pró-inflamatórias, além de provocar a ativação de outros mecanismos fisiológicos, ocasionando mais neurotoxicidade (DRINGEN; SCHEIBER; MERCER, 2013; RIZOR *et al.*, 2019).

Astrócitos e micrógliia quando estão com fenótipo ativado produzem vários mediadores pró-inflamatórios e fatores neurotóxicos, incluindo citocinas, como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-1 e 6 (IL-1 e IL-6), e quimiocinas, incluindo interferon gama, proteína inflamatória de macrófagos, proteína induzível e radicais livres, como óxido nítrico (NO) e superóxido dismutase (SOD) (LULL; BLOCK, 2010; XIE *et al.*, 2022).

Processos inflamatórios ocorrem no cérebro na DA, incluindo gliose e recrutamento de micrógliia para os locais de patologia da DA (XIE *et al.*, 2022). Células gliais (micrógliia, astrócitos e oligodendrócitos) atuam como células de suporte neuronal e mantêm a saúde dos neurônios (GUERRERO *et al.*, 2021) (Figura 4). A neurotoxicidade gerada pelo peptídeo A β está relacionada com a ativação micrógliial prolongada, o que acaba resultando em um aumento na produção de mediadores pró-inflamatórios (ALASMARI *et al.*, 2018)

Figura 4 - Ativação da Micróglia e Resolução da Inflamação



Fonte: (Adaptado de Jasmine Pathan, 2023, criado com BioRender.com)

Contrastando com a organização altamente ramificada apresentada pela micróglia no estado de vigilância, as células micrógliais reativas são caracterizadas por morfologia amebóide, que favorece a fagocitose (STENCE *et al.*, 2001; GUERRERO *et al.*, 2021). Dessa forma, a neuroinflamação ocorre em regiões cerebrais lesionadas, o que pode ser devido a espécies reativas de oxigênio (EROs), óxido nítrico (NO), citocinas e quimiocinas produzidas por células da glia ativadas (BIBER *et al.*, 2014; PAASILA *et al.*, 2022). No entanto, a reatividade sustentada das células micrógliais, juntamente com a produção excessiva de moléculas neurotóxicas, tem um papel prejudicial e contribui para a neurodegeneração, na qual a perda neuronal é acompanhada por condições neuroinflamatórias aumentadas (BIBER *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2015; XIE *et al.*, 2022).

Estudos têm revelado que pacientes com DA apresentam níveis elevados de mediadores inflamatórios, incluindo fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa), e interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-18 no soro e no líquido cefalorraquidiano (LCR) (PAASILA *et al.*, 2022; KOYA; REZNIK, 2021).

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). Assim como pacientes com DA, modelos animais transgênicos da doença apresentaram níveis elevados dessa citocina no LCR e no cérebro (JIN

et al., 2008; SWARDFAGER *et al.*, 2010). Adicionalmente, pacientes com transtorno cognitivo leve apresentaram aumento significativo de TNF- α , indicando a participação desta citocina em eventos iniciais da patogênese da DA (SINYOR *et al.*, 2020; DHAPOLA *et al.*, 2021).

1. 4 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) na DA

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), um membro da família das neurotrofinas, é essencial para o crescimento, sobrevivência, diferenciação dos neurônios, orientação de axônios e dendritos, plasticidade sináptica e liberação de neurotransmissores no SNC (GHONEIM *et al.*, 2015; AMIDFAR *et al.*, 2020).

O BDNF está presente em altas concentrações em regiões do cérebro humano, como hipocampo, hipotálamo, córtex e cerebelo, e desempenha um papel significativo na aprendizagem, memória e funções cognitivas (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007). O BDNF é sintetizado, principalmente, em corpos celulares de neurônios e células gliais e depois transportado para terminais pré-sinápticos e dendritos pós-sinápticos (GAO *et al.*, 2022). A localização do BDNF e seu receptor, receptor de tropomiosina quinase B (TrkB), nas sinapses de glutamato regula a liberação de neurotransmissores, a atividade do canal iônico, a orientação axonal e a excitabilidade neuronal (SCHINDER; POO, 2000; GAO *et al.*, 2022). O BDNF está envolvido nos processos de aprendizado e memória, por se ligar ao seu principal receptor funcional TrkB, presente principalmente no hipocampo e no córtex (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007).

O mRNA do BDNF está distribuído por todo o sistema nervoso central (SNC), incluindo as regiões cortical, hipocampal, nigral, amígdala e talâmica (ERNFORS *et al.*, 1990). O nível mais alto de mRNA do BDNF é encontrado no hipocampo (GUO *et al.*, 2018). A expressão hipocampal de BDNF está localizada principalmente na região Corno de Amon 2 (CA2), na porção medial do Corno de Amon 1 (CA1) e nos núcleos das células granulares no giro denteado e na camada de células piramidais (GUO *et al.*, 2018). Além disso, o BDNF é encontrado no córtex entorrinal, no hipocampo, local de aquisição e consolidação da memória, e córtex cerebral (ERICKSON *et al.*, 2012; GUO *et al.*, 2018). Verificou-se que o BDNF produzido no córtex entorrinal é ativamente transportado para o hipocampo (ERICKSON *et al.*, 2012).

O pro-BDNF é a forma precursora do BDNF produzida inicialmente; este precursor é posteriormente clivado pela enzima plasmina para produzir o BDNF maduro (mBDNF)

(AMIDFAR *et al.*, 2020). O pro-BDNF e o mBDNF têm efeitos diferentes na atividade neuronal porque se ligam a diferentes receptores e ativam diferentes vias de sinalização. O pro-BDNF interage com o receptor pan-neurotrofina (p75NTR), enquanto o mBDNF se liga com alta afinidade ao receptor de tirosina quinase B (TrkB) (p75), resultando em atividades antagônicas. Enquanto o pró-BDNF causa retração dendrítica, LTD e morte, o mBDNF promove o desenvolvimento dendrítico, sobrevivência celular e LTP (GAO *et al.*, 2022).

O receptor TrkB é dimerizado e autofosforilado ao se ligar com o BDNF e, como resultado dessa ligação, as vias de sinalização MAPK/ERK (proteína quinase ativada por mitógenos – que estimulam a divisão celular) e Fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/Akt (proteína serina/treonina quinase multifuncional regulada através da via PI3K) são ativadas, as quais regulam vários processos celulares, como processos de crescimento celular, diferenciação celular, apoptose e respostas celulares à inflamação (GAO *et al.*, 2022). O alvo a jusante desse mecanismo, o CREB (proteína de ligação responsiva ao AMPc - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico), estimula a transcrição de genes essenciais para a sobrevivência e desenvolvimento dos neurônios, incluindo a proteína Linfoma de células B 2 (BCL-2), que possui efeito antiapoptótico ao inibir a liberação do citocromo C, proteína essencial da cadeia transportadora de elétrons (AMIDFAR *et al.*, 2020; LIMA GIACOBBO *et al.*, 2019). Além da inativação da enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3) e a superexpressão de Proteína associada a bcl-2 (BAX) para mediar a lesão apoptótica. Quando a GSK-3 permanece em sua forma ativa, induz a hiperfosforilação da proteína tau nas células nervosas, resultando na desestabilização dos microtúbulos e na formação do emaranhado neurofibrilar, presentes na DA (AMIDFAR *et al.*, 2020). A interação entre o pró-BDNF e o p75NTR induz a apoptose por meio da cascata JNK (quinase c-Jun n-terminal). O NF- κ B (fator nuclear kappa B) ativado promove a expressão do gene β -secretase 1 (BACE1), resultando na superexpressão da proteína BACE1 e aumento da atividade da enzima BACE1, levando à formação do peptídeo A β a partir do APP. Como resultado, o peptídeo A β inibe a expressão do receptor TrkB, levando à neurodegeneração (GAO *et al.*, 2022).

As anormalidades sinápticas são uma característica fundamental da DA, que são conhecidas por surgir à medida que a doença progride (GAO *et al.*, 2022). Os níveis de BDNF no cérebro, no sangue e líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com DA são reduzidos (FORLENZA *et al.*, 2015; NG *et al.*, 2019; PENG *et al.*, 2005). Além disso, níveis séricos mais elevados de BDNF foram correlacionados com função cognitiva melhorada na DA e esses achados levaram a um interesse crescente no BDNF como um potencial biomarcador para o diagnóstico ou como terapia para a DA (WEINSTEIN *et al.*, 2014).

Foi demonstrado que a sinalização do BDNF, através do TrkB, está envolvida na fisiopatologia e nos déficits cognitivos da DA (KEMAPPINEN *et al.*, 2012). O BDNF é crucial na plasticidade neuronal, aprendizagem e memória. Estudos tem evidenciado que os níveis de BDNF e seu principal receptor TrkB diminuem na DA (HAN *et al.*, 2013). Estudos também demonstraram que o BDNF e o TrkB são capazes de proteger contra o comprometimento da memória e regular a neurogênese no hipocampo da DA (NAGAHARA *et al.*, 2009; KEMAPPINEN *et al.*, 2012).

O silenciamento do RNA antisense do BDNF pode regular positivamente o BDNF, reduzir a neurotoxicidade induzida por A β e aumentar a viabilidade neuronal (GUO *et al.*, 2018). Evidências crescentes também sugerem que a sinalização do BDNF desempenha um papel crítico na modulação das consequências a jusante do acúmulo de A β na DA. O BDNF medeia a ligação entre inflamação e neuroplasticidade, regulando a liberação de neurotransmissores (como glutamato e ácido gama-aminobutírico) após a ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) (GALIC *et al.*, 2012; DI FILIPPO *et al.*, 2013).

1.5 Memória na DA

A memória pode ser definida como um processo de codificação, armazenamento e recuperação de informações sobre estímulos externos e internos, ou apresentação de informações ao sistema nervoso de um organismo que pode ser usado para reagir e posicionar o organismo em relação a novos estímulos (JAHN, 2022).

As categorias das memórias podem ser diferenciadas de acordo com sua persistência temporal, englobando as memórias de longo prazo, memórias de curto prazo e memórias operacionais (*working memory*) (GOLD; McGAUGH, 1975; FOTUHI *et al.*, 2020). A memória operacional, também conhecida como memória de trabalho, possui uma duração muito curta e transitória, desempenhando o papel de armazenar temporariamente (por alguns segundos ou minutos) informações relevantes para o pensamento imediato e a resolução de problemas, podendo ser prontamente descartadas (esquecidas) logo em seguida (IZQUIERDO; MEDINA, 1991; FOTUHI *et al.*, 2020).

A memória de curta duração tem uma duração de minutos ou horas e desempenha um papel crucial na manutenção da nossa percepção do presente. Ela depende das áreas do cérebro, como o lobo frontal e o lobo parietal. Essa forma de memória em curto prazo abrange o período em que as memórias dos eventos em andamento estão sendo consolidadas e convertidas em memórias de longo prazo (DUDAI, 2004; TAKEHARA-NISHIUCHI, 2021).

Nesse período, a memória de curta duração está suscetível a desvanecer, enquanto as memórias de longo prazo demonstram alta resistência e permanecem mesmo diante de lesões cerebrais graves (SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1996; TAKEHARA-NISHIUCHI, 2021).

O processo de consolidação das memórias de curto prazo em memórias de longo prazo ocorre através da plasticidade neural e envolve o hipocampo e regiões adjacentes do córtex temporal medial (SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1996). Mecanismos como a potenciação de longa duração (LTP, do inglês “*long-term potentiation*”) e a depressão de longa duração (LTD, do inglês “*long-term depression*”) têm sido propostos para explicar essa transformação (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993), (IZQUIERDO; McGAUGH, 2000; TAKEHARA-NISHIUCHI, 2021). As memórias de longo prazo, embora mais estáveis, requerem um período mínimo de 6 a 12 horas para serem codificadas na rede neural e podem ser classificadas em memórias explícitas ou declarativas e memórias implícitas ou não-declarativas (IZQUIERDO; McGAUGH, 2000).

A memória declarativa está associada a experiências pessoais, reconhecimento de cenas e objetos familiares. Envolve a recordação consciente de eventos específicos, como a memória episódica (relacionada a um local e momento específicos), e a memória semântica (conhecimento geral não ligado a um contexto espacial ou temporal específico) (ERICSSON; KINTSCH, 1995; TAKEHARA-NISHIUCHI, 2021). Por outro lado, a memória não declarativa, também chamada de implícita ou de procedimento, abrange diversas formas de memória que não são acessíveis diretamente à consciência. Inclui habilidades, hábitos de aprendizagem, condicionamento clássico e o “*priming*”, que é a capacidade de identificar ou detectar um estímulo devido à exposição prévia (ERICSSON; KINTSCH, 1995).

Existem diversas evidências na literatura que indicam que os diferentes tipos de memória são regulados por sistemas neuroanatômicos distintos (DUDAI; MORRIS, 2013). Portanto, a memória é composta por quatro componentes fundamentais: um componente neocortical não-frontal, que influencia a percepção em testes de memória implícita; um componente dos gânglios da base, que afeta os testes de memória procedural sensorio-motora; um componente temporal medial/hipocampal, responsável pela aquisição, retenção e evocação de memórias explícitas; e um componente do lobo frontal, que controla a memória de trabalho ou operacional (MOSCOVITCH, 1992; DUDAI; MORRIS, 2013).

As evidências moleculares demonstram claramente que a memória de curta e longa duração são regidas por mecanismos distintos, independentes e paralelos (IZQUIERDO *et al.*, 1999, 2002; AHMED *et al.*, 2018). A consolidação permite que as informações vulneráveis a

perturbações sejam fixadas e estabilizadas na rede neural e envolve diversos mecanismos, como a transcrição de genes e a síntese de novas moléculas (ALKON *et al.*, 2005).

A neurodegeneração progressiva é uma característica-chave da DA, e a redução gradual de sinapses e espinhas dendríticas em áreas cerebrais relacionadas ao aprendizado e memória, como o hipocampo e o neocórtex, está fortemente correlacionada com o declínio cognitivo na DA (POOLER; ONBLE; HANGER, 2014; SCHEFF *et al.*, 2006). Estudos indicam que a diminuição na transmissão sináptica ocorre nas fases iniciais da DA, e uma disfunção sináptica prévia à neurodegeneração é observada em pacientes com DA (ARENDDT, 2009). Essa disfunção sináptica não se limita à redução do número de sinapses, mas também envolve atividade anormal de redes neurais, que interfere nos mecanismos de aprendizagem e pode contribuir para a hiperestimulação citotóxica associada aos processos neurodegenerativos (PALOP; MUCKE, 2010; VERRET *et al.*, 2012). Essas observações sugerem que a neurodegeneração na DA é precedida por uma disfunção na plasticidade sináptica e pela redução no número de sinapses, sendo a diminuição da plasticidade sináptica o principal responsável pelo declínio cognitivo na doença (HUANG; MUCKE, 2015).

Além disso, é consenso que a DA começa clinicamente com queixas de memória, afetando a memória episódica, a produção da fala, a nomeação semântica e a orientação visual (AHMED *et al.*, 2018; KIROVA *et al.*, 2015). Os déficits de atenção e memória de trabalho, associados a danos nos circuitos subcorticais frontais, também influenciam as funções executivas na DA, prejudicando o planejamento, a resolução de problemas e o comportamento dirigido a objetivos, como a capacidade de modificar o comportamento ou implementar respostas alternativas (JAHN, 2022).

Em um estudo clínico realizado por Erk e colaboradores (2011), pacientes com queixas de memória subjetiva foram submetidos a tarefas de memória episódica associativa e memória de trabalho, enquanto passavam por ressonância magnética funcional. Foi observada uma redução na ativação do hipocampo direito durante a recuperação da memória episódica, mesmo na ausência de déficits de desempenho. Em contraste, houve um aumento da ativação do córtex pré-frontal dorsolateral direito. Essas diferenças de ativação cerebral não foram encontradas para a memória de trabalho, sugerindo uma possível disfunção neuronal precoce no hipocampo e a utilização de mecanismos compensatórios que preservam o desempenho da memória.

Tanto o neocórtex quanto o hipocampo desempenham papéis cruciais na formação da memória (JAHN, 2013; DUDAI; MORRIS, 2013). Embora a neurodegeneração seja uma característica morfológica da DA, evidências crescentes sugerem que a disfunção e a perda de

conexões sinápticas no neocórtex e no hipocampo podem ser eventos precursoras da doença (POOLER; NOBLE; HANGER, 2014; SCHEFF *et al.*, 2007). Os primeiros sinais clínicos da DA geralmente envolvem déficits na capacidade de criar e reter novas memórias (JAHN, 2022). Além disso, a DA é caracterizada por uma progressiva atrofia neocortical, com perda gradual de sinapses e neurônios (JAHN, 2013; JAHN, 2022).

Dessa forma, tanto a memória explícita quanto a implícita são prejudicadas na DA, indivíduos com demência enfrentam dificuldades para pensar, armazenar e recuperar novas memórias; expressar conceitos abstratos e experimentam uma deterioração na função cognitiva (LAZAROV; HOLLANDS, 2016). Além disso, é comum que desenvolvam quadros de depressão e ansiedade, agravando ainda mais os déficits cognitivos (MOHAMED NOUR; JIAO; TENG, 2021; MENDEZ, 2021). Conforme a doença progride, há um declínio significativo nas habilidades executivas e uma manifestação cada vez maior da demência, o que leva os pacientes com DA a se tornarem incapazes de realizar suas atividades diárias.

1. 6 Hipóteses sobre a etiopatologia da DA

1. 6. 1 Cascata Amiloide

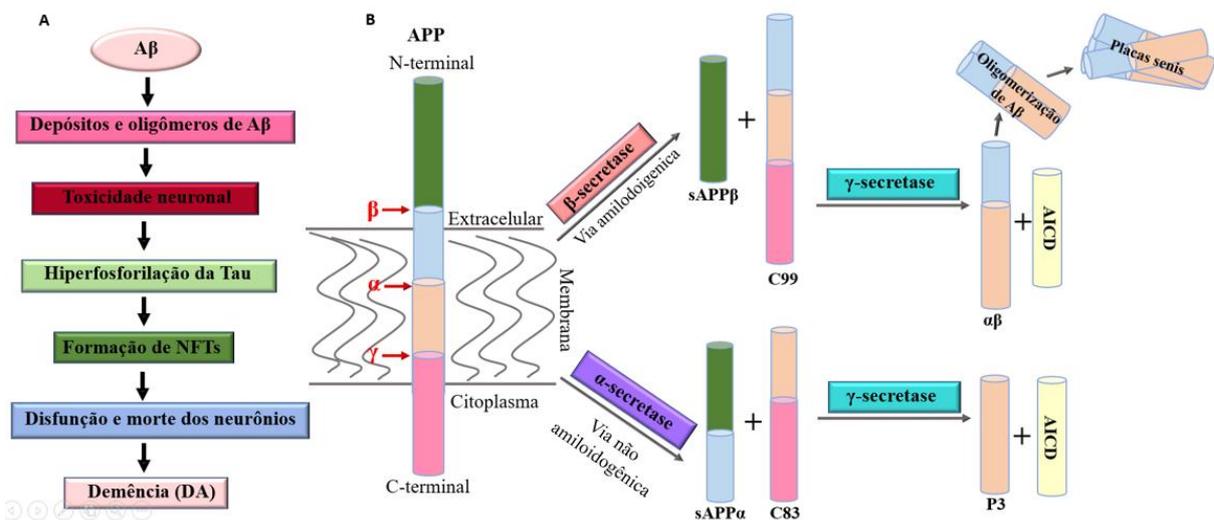
Durante as últimas décadas, muitas hipóteses foram geradas para explicar a fisiopatologia da DA. A Hipótese da Cascata Amiloide, proposta por George Glenner em 1984 (GLENNER; WONG, 1984), considera como ponto chave no desenvolvimento da doença os efeitos neurotóxicos do A β , onde o acúmulo das formas solúveis desse peptídeo leva à toxicidade sináptica e à neurotoxicidade, ocasionando a quebra da homeostase do cálcio, a indução de disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, resultando em deposição intracerebral de A β , juntamente com lesões cerebrais como emaranhados neurofibrilares, neuritos distróficos (XIAN-HUI *et al.*, 2014; SELKOE; HARDY, 2016; GUO *et al.*, 2021). A β solúvel apresenta neurotoxicidade ainda maior que fibrilas, e precede a formação de placas amiloides (WIRTZ *et al.*, 2013; GODYN *et al.*, 2016).

Na DA, o processo de neurodegeneração é iniciado pela "hipótese da cascata amiloide", que envolve a clivagem proteolítica da proteína precursora amiloide (APP) e resulta na geração, agregação e deposição da substância A β , levando à formação de placas senis. Em condições normais, a APP é degradada por enzimas proteolíticas chamadas α -secretases e β -secretase, ocorrendo a clivagem não-amiloidogênica ou amiloidogênica (QUERFURTH; LAFERLA, 2010; GUO *et al.*, 2021), respectivamente (FIGURA 5) e

retirado do encéfalo através de um balanço entre efluxo e influxo, mediados pela proteína receptora de LDL (Lipoproteína de Baixa Densidade) e receptores para produtos finais de glicosilação avançada.

A APP pode produzir sAPP α (Proteína precursora de α -amiloide secretada) via a proteólise realizada pela ação da α -secretase, produzindo formas clivadas solúveis, visto não ocorrer a produção do peptídeo A β , e possíveis de serem depuradas do sistema nervoso central (SNC) (LAMMICH *et al.*, 1999; FERNANDEZ *et al.*, 2016). Na via amiloidogênica, o peptídeo A β é gerado a partir da APP por dois eventos de clivagem consecutivos: a atividade proteolítica realizada pela β -secretase, que gera uma extremidade do peptídeo A β , enquanto o complexo enzimático γ -secretase, o qual é constituído pelas proteínas preselinas 1 e 2 (PS1 e PS2) e outras proteínas, gera outra extremidade. O complexo γ -secretase pode agir em três diferentes sítios de clivagem, gerando os peptídeos A β 1–38, A β 1–40 e A β 1–42, os quais são críticos para o processo de agregação do peptídeo A β , com o peptídeo A β 1–42 apresentando o maior grau de propensão a agregação (SUZUKI *et al.*, 1994; GUO *et al.*, 2021; FERNANDEZ, M. *et al.*, 2016), como demonstrado na Figura 5.

Figura 5 - Esquema do Metabolismo da APP



Fonte: (Adaptado de SUN *et al.*, 2015)

A clivagem da APP ocorre pela via não amiloidogênica ("fisiológica") ou amiloidogênica ("patológica"). 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. A) Progressão da DA. B) Vias não amiloidogênica e amiloidogênica.

Tem sido argumentado nos últimos anos que um balanço alterado entre a produção e a depuração do peptídeo A β , que levam ao depósito de oligômeros deste peptídeo no espaço

extracelular, o que pode levar a um estresse oxidativo na célula (GELLA; DURANY, 2009; FERNANDEZ, M. *et al.*, 2016; SHEPPARD; COLEMAN, 2020). Verificou-se que os peptídeos A β são degradados proteoliticamente no cérebro, principalmente pela neprilisina (NEP) e pela enzima de degradação da insulina (EDI) (BARANELLO *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2021).

Outra característica histológica de DA são os ENF que são formados a partir da degeneração do citoesqueleto neuronal decorrente da hiperfosforilação da proteína tau (GONZALEZ-DOMINGUEZ *et al.*, 2014).

1. 6. 2 Metabolismo da glicose no cérebro

O sistema nervoso central, juntamente com os órgãos vitais como o coração, o fígado e os rins, é responsável por utilizar cerca de 60% da energia fornecida ao corpo durante o repouso (CUNNANE *et al.*, 2011; HOYER, 2003). Pesquisas realizadas tanto em ambiente controlado (*in vitro*) quanto em organismos vivos (*in vivo*) têm revelado que a maior proporção de glicose utilizada pelo cérebro destina-se à preservação dos gradientes iônicos pré e pós-sinápticos, fundamentais para as transmissões neuronais excitatórias, bem como para a manutenção do potencial de repouso dos neurônios (ATTWELL; IADECOLA, 2002; SHULMAN *et al.*, 2004). A glicose essencial para o adequado funcionamento do cérebro é transportada através das membranas celulares e das barreiras por meio de duas categorias de transportadores saturáveis e específicos: os transportadores de glicose independentes de sódio (GLUT) e os transportadores de glicose dependentes de sódio (SGLT) (SHAH *et al.*, 2012).

Os transportadores de glicose GLUT desempenham um papel fundamental na captação de glicose do sistema vascular para o cérebro por meio de três etapas. Primeiro, a isoforma GLUT1, com peso molecular de 55kDa, facilita o transporte através do endotélio da barreira hematoencefálica (BHE). Em seguida, uma segunda isoforma de 45kDa presente nos astrócitos transfere a glicose para os neurônios por meio do GLUT3 (SHAH *et al.*, 2012). No entanto, a absorção líquida de glicose pelo cérebro depende da expressão e atividade do GLUT3, que é considerado o principal transportador de glicose, além das concentrações de glicose nos compartimentos separados pela BHE. (DUELLI; KUSCHINSKY, 2001).

Embora a insulina seja principalmente sintetizada pelas células β do pâncreas e atravesse a barreira hematoencefálica, também pode ser produzida localmente em certas regiões cerebrais, como o hipocampo, córtex pré-frontal, córtex entorrinal e bulbo olfatório (HOYER, 2003; WEI; KOYA; REZNIK, 2021). Embora as ações da insulina cerebral não sejam totalmente compreendidas, a ligação da insulina ao seu receptor inicia a

autofosforilação da subunidade β do receptor, levando à ligação e fosforilação da tirosina de vários substratos do receptor de insulina, incluindo os Receptores de Insulina (IR), IRS-1 e IRS-2, que desempenham um papel na plasticidade sináptica e na formação da memória (KAMAT *et al.*, 2015; ARNOLD *et al.*, 2018; SĘDZIKOWSKA; SZABLEWSKI, 2021).

Curiosamente, a insulina pode modular diretamente a plasticidade sináptica, o aprendizado e a memória, e os distúrbios nas vias de sinalização da insulina na periferia e no cérebro foram implicados na DA e no envelhecimento do cérebro (KAMAT *et al.*, 2015). Essas regulações negativas pela insulina levam a efeitos mais devastadores para a função neurológica. Por outro lado, a insulina injetada intracerebroventricularmente no cérebro pode melhorar o desempenho de tarefas de memória em animais (GRUNBLATT *et al.*, 2006). Além disso, a insulina administrada por via intranasal aumentou o desempenho de tarefas relacionadas à atenção em humanos (HOLSCHER, 2011).

Os Receptores de Insulina (IR's) estão abundantemente presentes no cérebro, estando presentes em todos os tipos de células, mas distribuídos seletivamente, sendo encontrados em maior concentração nos terminais nervosos de regiões-chave do cérebro, como bulbo olfatório, hipotálamo, córtex cerebral, corpo estriado, cerebelo e hipocampo (WEI; KOYA; REZNIK, 2021; De FELICE, 2013; ARNOLD *et al.*, 2018;).

O declínio dependente da idade no nível de insulina cerebral (SARTORIUS *et al.*, 2015) e na neurogênese (KEMPERMANN *et al.*, 2002; SĘDZIKOWSKA; SZABLEWSKI, 2021) implicam que a insulina pode estar envolvida na regulação da neurogênese. 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 mitógenos (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 (WEI; KOYA; REZNIK, 2021; SUN *et al.*, 2020). Estudos mostraram que a atividade da GSK-3 β , embora, não seja a principal causa de demência, aumenta a produção de A β , hiperfosforilação de Tau e degeneração neuronal (KANG; LEE; LEE, 2017), além de aumentar a probabilidade de mutação de PS1, que aumenta a clivagem de γ -secretase da atividade de APP (ZHOU; ZHANG, 2021).

A regulação da expressão do gene Tau e a fosforilação anormal durante a DA são influenciadas por vias de sinalização da insulina, indicando uma conexão direta entre a patologia da DA e o sistema de sinalização insulinérgica (SCHUBERT *et al.*, 2003).

Pesquisas também têm indicado que a progressão avançada da DA, semelhante ao processo de envelhecimento, está relacionada a níveis reduzidos de insulina e fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) no cérebro, bem como a alterações nos genes do RI (WATSON; CRAFT, 2003). Outros estudos corroboram que a insulina também regula negativamente o metabolismo das proteínas A β e tau, que são os principais blocos de construção das placas amilóides e emaranhados neurofibrilares, e são marcas neuropatológicas bem documentadas da DA (KAMAT *et al.*, 2015).

A sinalização da insulina ocorre por meio de duas vias de transdução: a via da quinase fosfatidil-inositol 3 (PI3 quinase) e a via da proteína quinase ativada por mitógenos (MAP quinase). Essas vias regulam o processo de captação de glicose pelas células (JOHN *et al.*, 2003). Curiosamente, a disfunção na sinalização da insulina acelera a produção de A β no cérebro, promovendo o processamento amiloidogênico da APP, o que resulta em um aumento na formação de fibrilas a partir de oligômeros de A β . Dessa forma, a resistência à insulina induzida por oligômeros pode iniciar um ciclo vicioso entre o aumento na produção e agregação de A β , interrompendo as funções fisiológicas da insulina e contribuindo, em parte, para o acúmulo de A β nos cérebros de pacientes com DA (De FELICE *et al.*, 2014; SĘDZIKOWSKA; SZABLEWSKI, 2021).

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).

1. 7 Resistência à insulina no SNC na DA

Pesquisas têm revelado que a presença de diabetes tipo 2 aumenta a probabilidade de desenvolvimento de DA em comparação com pessoas sem problemas de saúde metabólica (RANI *et al.*, 2016; CHAKRABARTI *et al.*, 2015) e uma forma recentemente identificada de resistência à insulina no cérebro, conhecida como "estado cerebral com resistência à insulina", tem sido relacionada à DA (CRAFT, 2007; De La MONTE, 2009; ARNOLD *et al.*, 2018) levantando a hipótese de que a DA se trata de uma nova forma de diabetes, chamada de diabetes tipo 3 (CRAFT, 2007; ARNOLD *et al.*, 2018).

Um estudo relatou que os níveis de receptores de insulina são regulados negativamente no cérebro de pacientes com DA (LONG-SMITH *et al.*, 2013). Verificou-se que os receptores de insulina estão internalizados nos neurônios, e ambos os receptores de insulina (IRS)-1 e

IRS-2 foram reduzidos, o que, em conjunto, leva à redução da atividade de sinalização da insulina. Está se tornando cada vez mais aparente que a alteração de moléculas de sinalização que são conhecidas por estarem envolvidas na transdução do sinal de insulina pode desempenhar um papel na patogênese da DA (ARNOLD *et al.*, 2018).

Além disso, a deficiência na sinalização da insulina já foi observada em análises *post mortem* em pacientes e em modelos animais de DA (LESTER-COLL *et al.*, 2006; STEEN *et al.*, 2005; TRAMUTOLA *et al.*, 2020), existindo uma associação entre resistência à insulina e atrofia cerebral e menor memória em idosos acima de 60 anos de idade (WILLETTE *et al.*, 2013; CRANE *et al.*, 2013; CHERBUIN *et al.*, 2012). A sinalização de insulina é particularmente importante para o aprendizado e a memória (CHIU, *et al.*, 2008; DOU *et al.*, 2005; SĘDZIKOWSKA; SZABLEWSKI, 2021), sugerindo que a resistência à insulina pode contribuir para os déficits cognitivos na DA.

As vias neuropatogênicas envolvidas tanto na resistência à insulina periférica observada no diabetes tipo 2 quanto na sinalização da insulina no cérebro de indivíduos com DA apresentam semelhanças no processo de geração do peptídeo A β (De FELICE *et al.*, 2014). Indivíduos com DA apresentaram uma redução na captação de glicose pelo cérebro, mesmo na ausência de atrofia estrutural, e essa diminuição pode ser detectada até três décadas antes do início dos sintomas clínicos esperados da DAF (MOSCONI *et al.*, 2006).

1. 8 Diagnóstico e tratamento da DA

O diagnóstico da DA é principalmente fundamentado em características clínicas relatadas no histórico médico e em uma avaliação clínica minuciosa, especialmente neurológica e psiquiátrica (FROTA *et al.*, 2011; BOMASANG-LAYNO; BRONSTHER, 2021). O perfil clínico manifesta mudanças cognitivas e comportamentais, principalmente associadas à deterioração da memória episódica e espacial (MENCHOLA *et al.*, 2015). A inclusão de testes laboratoriais e exames de neuroimagem é essencial para distinguir o diagnóstico da DA de outras formas de demência (VECCHIO *et al.*, 2021).

Pesquisas em neuroimagem funcional para o diagnóstico de DA se concentram em um traçador de PET chamado *Pittsburgh compound B* (PIB), que se liga especificamente em compostos A β , um marcador histopatológico específico da DA (KLUNK, *et al.*, 2004; PAPALIAGKAS *et al.*, 2023). As escalas, como o *Mini-Mental State Examination* – MMSE e o *Clinical Dementia Rating* – CDR, permitem avaliar a progressão dos sintomas (BLENONW *et al.*, 2006). Ademais, os biomarcadores do LCR (em particular, A β -42 e proteína tau, bem

como a relação t-Tau/Abeta42) podem ser usados na prática clínica de rotina para distinguir a DA dos controles, bem como outros tipos de demência (PAPALIAGKAS *et al.*, 2023)

O diagnóstico precoce da DA baseado somente em sintomas clínicos permanece um desafio, particularmente no estágio pródromo (ALUISE *et al.*, 2008). Essa dificuldade é refletida na baixa acurácia do diagnóstico clínico da DA utilizando métodos que não incluem informações sobre biomarcadores (BEACH *et al.*, 2012).

O diagnóstico conclusivo, no entanto, só é alcançado por meio da análise histopatológica de amostras obtidas em autópsias. Essa análise revela a perda de células neuronais nas camadas piramidais do córtex cerebral e a presença de intensas degenerações sinápticas tanto no hipocampo quanto no neocórtex (BOMASANG-LAYNO; BRONSTHER, 2021). Além disso, identifica-se a presença de depósitos extracelulares do peptídeo A β e a formação de emaranhados neurofibrilares intracelulares compostos pela proteína Tau hiperfosforilada (PERL, 2000; CHAUHAN; CHAUHAN, 2006; DAVIGLUS *et al.*, 2011; BOMASANG-LAYNO; BRONSTHER, 2021).

Encontrar tratamentos que possam alterar as características da DA tem sido um desafio considerável e de progresso lento. A maioria dos ensaios clínicos de novas terapias para a DA não obtém sucesso, frequentemente devido a efeitos colaterais significativos ou à falta de evidências de eficácia terapêutica (GODYN *et al.*, 2016). Atualmente não há nenhum tratamento definitivo para DA e os tratamentos existentes apenas retardam a progressão da doença e controlam alguns sintomas (CANADY *et al.*, 2023).

Dentre os tratamentos atuais da DA, estão às intervenções psicossociais (Terapia Ocupacional, Fonoaudiologia, Fisioterapia e Psicologia) e as farmacológicas, que são com os fármacos inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), os anticolinesterásicos (donezepil, rivastignina e galantamina) que aumentam a disponibilidade da acetilcolina na fenda sináptica, e os fármacos antagonistas dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (memantina), reduzindo a toxicidade das células cerebrais (SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013; GODYN *et al.*, 2016; CUMMINGS *et al.*, 2020). Ao bloquear a degradação da acetilcolina (ACh), essas drogas prolongam sua meia vida e ação nos receptores colinérgicos pré e pós-sinápticos (VECCHIO *et al.*, 2021). Esses medicamentos são incapazes de bloquear a progressão da doença, porém melhoram a qualidade de vida do paciente, existindo, assim, uma grande busca por novas alternativas terapêuticas, terapias essas que possam ser capazes de atuar diretamente no processo neurodegenerativo da DA (KAR *et al.*, 2004; VECCHIO *et al.*, 2021).

Foram exploradas tentativas para reduzir agregados de A β usando várias abordagens, incluindo inibidores de agregação, inibidores de secretase e imunoterapias, tanto em modelos

animais como em ensaios clínicos. No entanto, nenhum fármaco desenvolvido com base na hipótese da cascata amilóide tem sido demonstrado que funciona em pacientes com DA (SELKOE; HARDY, 2016; FILLIT; GREEN, 2021). Terapias direcionadas contra a proteína Tau aparentam ser mais promissoras, demonstrando menores riscos em geral quando comparadas às focadas em A β (GODYN *et al.*, 2016; CUMMINGS *et al.*, 2020). A maioria dos outros métodos terapêuticos sendo investigados não possuem resultados publicamente disponíveis ou aparentam ser pouco efetivos (GODYN *et al.*, 2016).

Duas drogas recentemente desenvolvidas para o tratamento de DA, anticorpos monoclonais, “Aducanumab” e “Lecanemab”, foram capazes de efetuar melhorias controversas, provocando redução de A β , porém com dados clínicos inconsistentes (KONPMAN *et al.*, 2021; PRILLAMAN, 2022) ou moderados (VAN DYCK *et al.*, 2022; PRILLAMAN, 2022). Somando-se a isso, a segurança de ambas é controversa, tendo indícios de que as duas drogas são capazes de causar efeitos colaterais potencialmente letais, como hemorragia cerebral (VAN DYCK *et al.*, 2022; PRILLAMAN, 2022; FILLIT; GREEN, 2021).

1. 9 Simulações de Ancoragem Molecular (Docking Molecular) na DA

A literatura destaca a importância das abordagens computacionais na descoberta de novos fármacos, permitindo a triagem virtual em grandes bibliotecas de dados moleculares, resultando em maior chance de sucesso e redução de custos na pesquisa (DEBNATH *et al.*, 2022). As ferramentas *in silico* utilizam técnicas computacionais, matemáticas, químicas, biologia molecular e bioquímica para análise e processamento de dados biológicos, incluindo análises funcionais e previsões de interação sítio-ligante (GUPTA *et al.*, 2022; SHAH *et al.*, 2022).

O *docking* molecular, amplamente utilizado na descoberta de novas moléculas, permite a análise da conformação e orientação de moléculas em alvos terapêuticos, como enzimas e receptores (FAN, 2021). Essa técnica é utilizada no desenvolvimento de fármacos, na previsão de interações e no desenho de novas moléculas com atividade biológica terapêutica (ASLEDU *et al.*, 2021; FAN, 2021). Esta técnica considera fatores como graus de liberdade e afinidade, visando a predição do modo de ligação e a interação entre as moléculas (FAN, 2021).

Em resumo, as abordagens computacionais, incluindo o *docking* molecular, desempenham um papel importante na aceleração da descoberta de fármacos, proporcionando

eficiência, previsão de interações e redução de custos na pesquisa (DEBNATH *et al.*, 2022; GUPTA *et al.*, 2022; SHAH *et al.*, 2022; ASLEDU *et al.*, 2021; FAN, 2021).

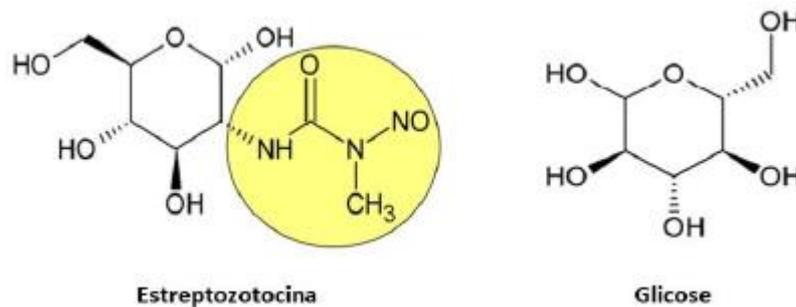
A aplicação de uma ampla gama de modelagem e técnicas computacionais revelou um forte interesse na estrutura, função e inibição da acetilcolinesterase, devido à sua ligação com a DA, para a qual nenhuma cura específica foi encontrada (FAN, 2021). Diversas pesquisas têm evidenciado a forma como inibidores e substratos se conectam aos sítios da AChE, revelando uma ampla gama de compostos, tais como cumarinas, chalconas, pirrolidinas, pirroles, triazóis, quinolinas e ácido clorogênico. Essas substâncias apresentam uma atividade inibitória significativa contra a acetilcolinesterase e exibem modos de ligação interessantes. (PEITZIKA; PONTIKI, 2023; BORAH *et al.*, 2023; IŞIK; BEYDEMIR, 2021).

1. 10 Modelo experimental de DAE induzida por ICV-STZ

Com 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).

O STZ (Figura 6) é um composto natural de natureza glicosamina-nitrosouréia, produzido pela bactéria Gram-positiva *Streptomyces acromogenes* (EILEEN DOLAN, 1997). Sua estrutura química é notavelmente semelhante à da glicose, diferindo apenas pela substituição de uma única hidroxila em C2 por um grupo nitrosuréia. Essa semelhança permite que a droga seja transportada para dentro da célula por meio do transportador de glicose 2 (GLUT 2) (LELOUP *et al.*, 1994; GRIEB, 2016).

Figura 6 - Estruturas químicas da estreptozotocina e glicose



Fonte: Adaptado de GOYAL *et al.* (2016)

Ela é seletivamente tóxica para as células produtoras e secretoras de insulina e não consegue atravessar a Barreira Hematoencefálica (BHE). Por esse motivo, é amplamente empregada para induzir diabetes experimental em roedores por meio de administração intraperitoneal (i. p.) (SZKUDELSKI, 2001).

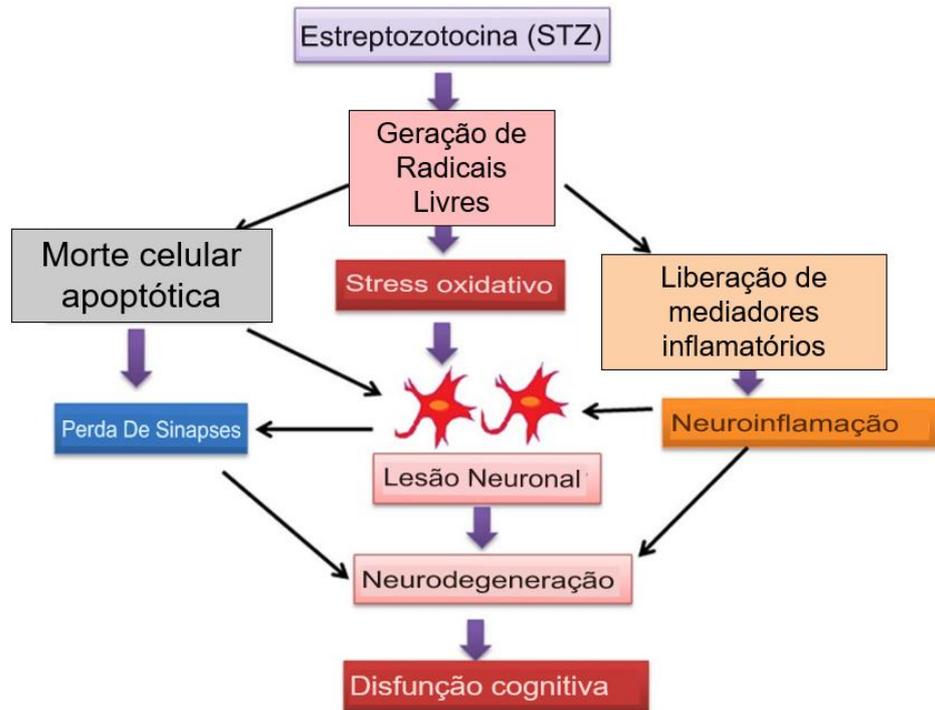
Quando administrada via periférica, age no pâncreas, destruindo permanentemente as células β pancreáticas produtoras de insulina, originando assim um quadro de Diabetes Melitus tipo 1 (BAYDAS *et al.*, 2003). No pâncreas, na dose em que a STZ é administrada (50 mg/kg), o mecanismo de ação consiste na captação de STZ pelas células β através de GLUT do tipo 2, onde provoca a morte celular por metilação e fragmentação do DNA, causando a necrose celular (SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013; GRIEB, 2016).

Diante da presença de insulina e dos receptores de insulina no cérebro, um modelo experimental para induzir um estado de resistência à insulina cerebral foi desenvolvido. Nesse modelo, a administração de STZ foi feita por via ICV-STZ, utilizando doses até 100 vezes menores do que as empregadas periféricamente (DUELLI *et al.*, 1994; LANNERT; HOYER, 1998; KAMAT *et al.*, 2016).

A ICV-STZ (1-3 mg/kg) causa uma espécie de dessensibilização dos RI e de Fator de crescimento de insulina (IGF), ambos do tipo tirosina cinase, alterando o funcionamento das enzimas envolvidas no metabolismo da glicose cerebral com consequentes alterações bioquímicas e fisiopatológicas semelhantes a algumas das alterações cerebrais observadas durante a DA (AGRAWAL *et al.*, 2011), induzindo a: déficits cognitivos (HOYER; LANNERT, 2007; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2006, 2007; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013), comprometimento da sinalização colinérgica (BLOKLAND; JOLLES, 1994), estresse oxidativo (KUMAR *et al.*, 2010; SAXENA *et al.*, 2011), redução do metabolismo encefálico da glicose (HOYER; LANNERT, 2007; CHEN *et al.*, 2013) e resistência à insulina no encefalo (AGRAWAL *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2015). O diagrama de fluxo na figura 7

representa a geração de radicais livres mediada por estreptozotocina (STZ) e sua influência no estresse oxidativo, morte celular apoptótica e neuroinflamação. Como o STZ não atravessa a BHE, não ocorre comprometimento sistêmico quando injetada (KAMAT *et al.*, 2016).

Figura 7 - Diagrama representando o efeito da estreptozotocina (STZ) no estresse oxidativo, morte celular apoptótica e neuroinflamação



Fonte: (modificado de KAMAT *et al.*, 2015).

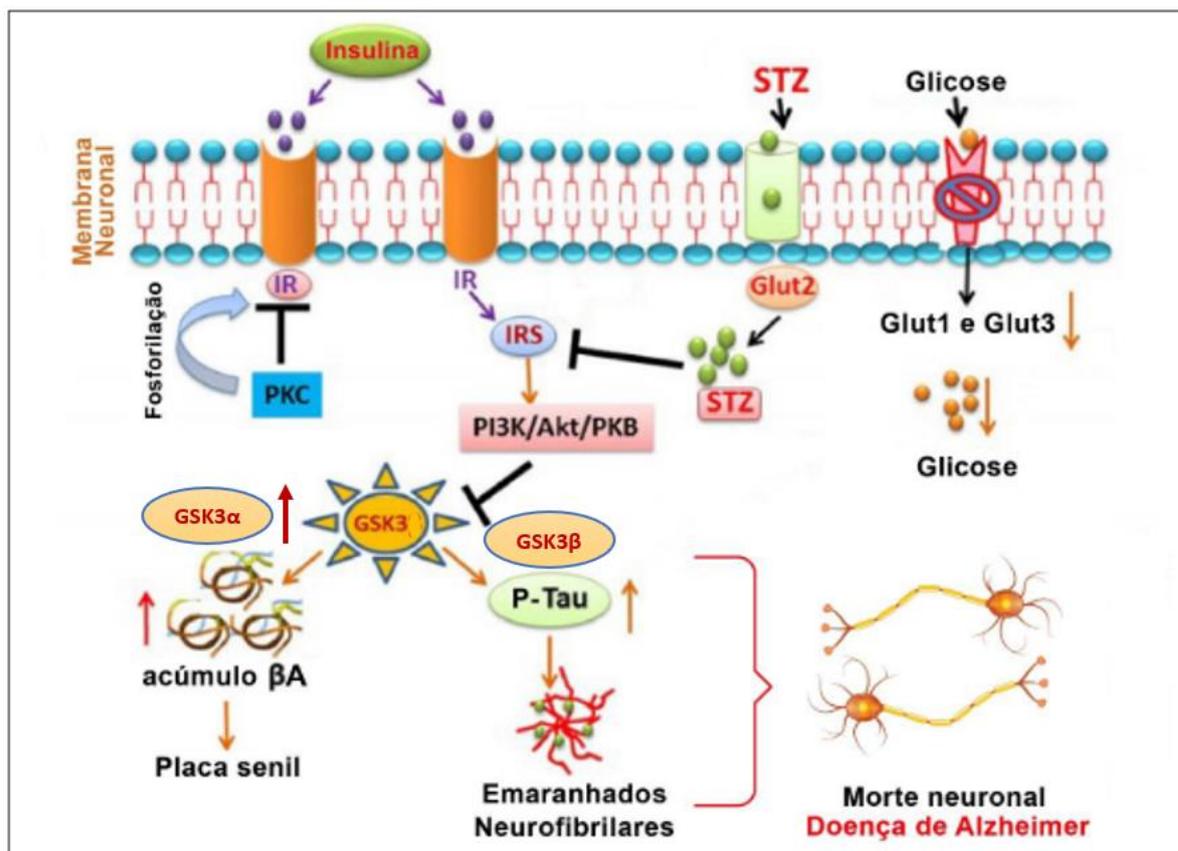
Todos esses fatores afetam coletivamente a função neuronal, o que pode implicar na patologia da Doença de Alzheimer.

A neuroinflamação é uma característica patológica da DA e precede a formação de placas e emaranhados durante a progressão da DA (KAMAT *et al.*, 2012). Existe uma estreita associação de neuroinflamação com patogênese da DA e envolve a ativação de células gliais (RAI *et al.*, 2014). Rai e colaboradores (2013) mostraram a ICV-STZ induz mediadores neuroinflamatórios e causa estresse oxidativo contribuindo para os processos neurodegenerativos.

Como mencionado, vários estudos mostram que a insulina neuronal protege da neuroinflamação e do estresse oxidativo, portanto, qualquer função prejudicada da insulina no cérebro prejudica a função neuronal (KAMAT *et al.*, 2015). Quando a insulina se liga ao seu receptor, tanto central como periféricamente, este recruta seu substrato no sítio de ancoramento, tornando-o fosforilado nos resíduos de tirosina. Este, por sua vez, torna-se

capaz de recrutar várias moléculas sinalizadoras, dentre estas a enzima fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K) (THORENS, 2011). Esta enzima fosforila o fosfoinosítido da membrana que ancora a proteína cinase B (PKB), a qual promove a translocação do receptor de glicose GLUT 4 para a membrana plasmática, promovendo maior aporte de glicose nos tecidos dependentes de insulina. Por outro lado, a PKB também modula por fosforilação a atividade da enzima glicogênio sintase cinase 3 (GSK-3), que, dependendo da sua isoforma, regula os peptídeos A β e a fosforilação da proteína Tau (SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2006). As formas presentes no citosol da enzima GSK-3 podem ser: a GSK-3 α e a GSK-3 β (SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2006; CORREIA *et al.*, 2011). Sendo que a GSK-3 β regula a fosforilação da proteína Tau (CHENG *et al.*, 2005) e a GSK-3 α está associada com a formação do peptídeo A β (PHIEL *et al.*, 2003). Este provável mecanismo de ação está ilustrado na Figura 8 (KAMAT *et al.*, 2015).

Figura 8 - Provável mecanismo de neurotoxicidade induzida pela STZ e a patologia DA.



Fonte: (modificado de KAMAT *et al.*, 2015)

Existe um transportador de glicose na membrana que facilita a entrada da STZ, o GLUT2. Após a entrada de STZ nas células, ele inibe a sinalização do IR e PI3K/AKT. A inibição de PI3K e AKT inibe a regulação da GSK-3 β , resultando em um aumento da sua atividade, o que facilita a acumulação de A β e a hiperfosforilação da Tau. O acúmulo de A β promove a formação de placa senil, e a hiperfosforilação de Tau promove a formação de emaranhados neurofibrilares, característica da DA. Por outro lado, as proteínas quinases B/C também inibem o

RI pela sua hiperfosforilação e dificultam a função normal da insulina nos neurônios. A STZ também reduz a expressão dos transportadores de glicose GLUT 1 e 3, prejudicando a entrada de glicose na célula.

A resistência à insulina ocorre quando os tecidos não respondem à insulina. Dados clínicos sugerem a expressão reduzida de genes como fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e receptores de IGF-1 no córtex frontal, hipocampo e hipotálamo de pacientes com DA (KAMAT *et al.*, 2015).

Lee e colaboradores (2014) demonstraram que a expressão de genes relacionados à sinalização de insulina/IGF é prejudicada principalmente no cérebro, córtex frontal e hipocampo em cérebro de macaco injetado com STZ e isso é semelhante ao estágio inicial de DAE, e as mudanças também foram acompanhadas pela perda de oligodendrócitos e neurônios.

Trabalhos demonstram que a ICV-STZ em dose subdiabetogênica reduz de 10 a 30% os níveis de glicose, o metabolismo energético, levando a disfunção mitocondrial, sobretudo em regiões do córtex cerebral e no hipocampo, com diminuição significativa das principais enzimas da via glicolítica (PATHAN *et al.*, 2005; SHINGO *et al.*, 2012; MICHAŁOWSKA-WENDER *et al.*, 2014).

Embora o mecanismo associado à resistência cerebral à insulina seja bem aceito, ainda não foi robustamente comprovado por dados experimentais (GRIEB, 2016). Além disso, o estresse oxidativo e neuroinflamação subsequentes que levam à morte neuronal é proposto como um segundo mecanismo do STZ (SHARMA; GUPTA, 2001; BASSANI *et al.*, 2017).

Assim, este modelo experimental não transgênico é o modelo animal mais amplamente aceito (DUBEY *et al.*, 2018) e fornece subsídios morfológicos e moleculares para o entendimento da DAE em humanos pela nova hipótese da diabetes tipo 3 (SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013; GRIEB, 2016), por possuir várias das características da doença e mimetizar a progressiva deterioração cognitiva e do metabolismo energético encefálico (GRÜNBLATT *et al.*, 2004; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013).

1. 11 O café

O café é a bebida mais consumida em todo o mundo, tendo sido descoberto há cerca de 2000 anos na Etiópia, provavelmente, os etíopes foram os primeiros a reconhecer seus efeitos energizantes (STEFANELLO, 2019). O café tem sido apreciado em diversas ocasiões, seja para encontros sociais, momentos de descanso, para melhorar o desempenho no trabalho ou promover o bem-estar geral. O tipo de café consumido está intimamente ligado aos hábitos sociais e à cultura de cada país (HOMAN; MOBARHAN, 2006). Consequentemente, há uma ampla gama de estudos que demonstram os efeitos biológicos do café na saúde humana (HIGDON; FREI, 2007).

O consumo regular de quantidades moderadas de café proporciona uma proteção robusta contra doenças crônicas associadas à idade (GROSSO, 2017; POOLE *et al.*, 2017; VAN DAM; HU; WILLETT, 2020) aumentando assim o tempo de vida ao envelhecer (KIM; JE; GIOVANNUCCI, 2019).

Estudos epidemiológicos e experimentais sustentam a ideia de que o consumo regular de café traz benefícios à saúde (KIM; JE; GIOVANNUCCI, 2019). A relação entre o café e várias doenças é de grande interesse, dada a grande variedade de compostos encontrados na bebida que podem potencialmente alterar os riscos de doenças degenerativas, progressivas e crônicas por meio de muitas ações biológicas, como proteger contra o câncer de pele (CAINI *et al.*, 2017), redução do risco de desenvolver Diabetes tipo 2, efeito benéfico na glicemia e na insulinemia em indivíduos com diabetes Mellitus tipo 2 (SANTOS; LIMA, 2016; HUXLEY *et al.*, 2006), atividade antiulcerogênica (SHIMOYAMA *et al.*, 2013).

Estudos demonstraram menor risco de DM tipo 2 naqueles que consumir duas ou mais xícaras de café por dia (DING *et al.*, 2014; HITMAN, 2014; WEDICK *et al.*, 2011). Entretanto, o consumo de café não pode diminuir o risco de DM tipo 2 em indivíduos com hábitos de vida negativos, ou seja, tabagismo, menor atividade física, obesidade e consumo de álcool (MULEY *et al.*, 2012; PATJA *et al.*, 2005; SHI *et al.*, 2013). Estudos também demonstraram que o café tem efeito anti-inflamatório, contribuindo para a redução da formação de placas de aterosclerose (CORNELIS *et al.*, 2018; LOFTFIELD *et al.*, 2015).

Um estudo de Takahashi e colaboradores (2017) mostrou que camundongos tratados com 0,1% de café por 17 semanas não tiveram a glicemia alterada, mas apresentaram redução no consumo total de alimentos e água durante o ciclo escuro, assim como nos níveis de ácidos graxos livres e triglicérides no plasma de camundongos. Os autores concluíram que o consumo de café teve um efeito positivo na atividade energética e no metabolismo lipídico

(TAKAHASHI *et al.*, 2017). Estudos epidemiológicos também identificaram que o consumo de café, particularmente de cafeína, correlaciona-se inversamente com a incidência ou evolução de perda da memória após envelhecimento ou DA (RITCHIE *et al.*, 2007).

1. 11. 1 Ácido Clorogênico

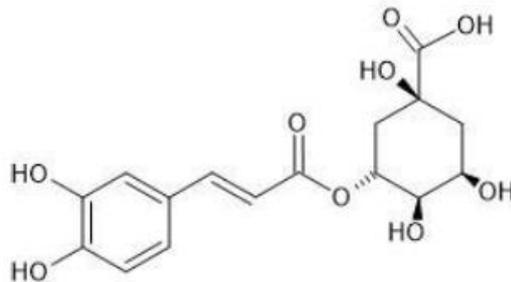
O ácido clorogênico (ACG) é um dos principais polifenóis da dieta humana, pois está presente no chá, café, feijão verde torrado, frutas vermelhas, cacau, frutas cítricas, maçãs e em muitos vegetais (NAVEED *et al.*, 2018; SANTANA-GÁLVEZ; CISNEROS-ZEVALLOS; JACOBO-VELÁZQUEZ, 2017). O ACG foi isolado do café por Gorter em 1908 (FELDMAN *et al.*, 1969). Uma família de ésteres de ácidos hidroxicinâmicos (incluindo ácido ferúlico, ácido cafeico e ácido p-cumárico) com ácido quínico também é algumas vezes referido como ácidos clorogênicos (CLIFFORD *et al.*, 2003; ROJAS-GONZÁLEZ *et al.*, 2022).

Os compostos fenólicos são constituintes encontrados em muitas plantas que são amplamente consumidas em frutas, verduras, cereais e legumes, além disso, estão presentes em algumas bebidas tais como vinho, chá e café (FARAH; DONANGELO, 2006). O consumo de compostos fenólicos está associado a uma variedade de efeitos benéficos para a saúde tais como: antioxidante, hipoglicêmico, hipolipidêmicos, anti-inflamatório, imunoestimulante, ansiolítica, neuroprotetora, entre outras (DEVI *et al.*, 2015; CURTI *et al.*, 2014; VRHOVSEK *et al.*, 2015; ORHAN *et al.*, 2015; JAIN, 2011). É conhecido que os flavonoides e seus metabólitos são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (ANDRES-LACUEVA *et al.*, 2005) e podem exercer ações neurofarmacológicas a nível molecular, influenciando vias de sinalização e expressão gênica (SPENCER, 2008).

O ACG é o maior composto fenólico presente no café, sendo que é encontrado em cerca de 14% nos grãos de café verdes (FARAH; DONANGELO, 2006) (Figura 9). O ACG exerce várias atividades biológicas importantes, incluindo modulação do metabolismo da glicose (MCCARTY *et al.*, 2005; NAVEED *et al.*, 2018), efeitos antinociceptivos (BAGDAS *et al.*, 2014), propriedades antioxidantes, anti-apoptótica (LI *et al.*, 2008; NAVEED *et al.*, 2018), anti-inflamatórias e anticarcinogênicas (MORS *et al.*, 2000; FARHOOD *et al.*, 2019), atividade antibacteriana, hepatoprotetora, cardioprotetora, antipirética, neuroprotetora, antiobesidade, antiviral, antimicrobiana, anti-hipertensiva, eliminador de radicais e um estimulador do sistema nervoso central (SNC) (NAVEED *et al.*, 2018). Um estudo evidenciou

que café verde, rico em ACG, produz efeitos positivos sobre a pressão arterial, níveis de glicose e triglicerídeos (SARRIÁ *et al.*, 2018).

Figura 9 - Estrutura química do ácido clorogênico



O ACG pode modular o metabolismo lipídico e a glicose em distúrbios relacionados ao metabolismo genético e saudável, fazendo com que haja um consumo maior da glicose (FARHOOD *et al.*, 2019). Especula-se que essa regulação possa ajudar a tratar muitos distúrbios, como esteatose hepática, doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade (NAVEED *et al.*, 2018).

Estudos tem demonstrado que o ACG pode inibir a síntese ou liberação de fator de necrose tumoral α (TNF- α) juntamente com outras citocinas pró-inflamatórias, demonstrando sua ação anti-inflamatória (KRAKUER, 2002; SANTOS *et al.*, 2006; NAVEED *et al.*, 2018). Também foi demonstrado seu efeito antioxidante, onde foi demonstrado que esse composto fenólico atua ligando-se e inativando rapidamente a radical hidroxila (OH) e outros radicais formados nos processos biológicos do organismo (KOON *et al.*, 1998).

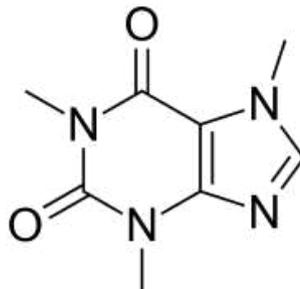
Intervenções com dietas enriquecidas em ACG demonstraram que este é capaz de melhorar o humor (MIAO *et al.*, 2020; CROPLEY *et al.*, 2012) e a função cognitiva (KATO *et al.*, 2018; SAITOU *et al.*, 2018) em voluntários. Além disso, evidências crescentes indicam que a ingestão de ACG diminui a incidência de diferentes doenças cerebrais, como demência (OCHIAI *et al.*, 2019; GAO *et al.*, 2021; ISHIDA *et al.*, 2020; JEONG *et al.*, 2013), depressão (LIM *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2021) ou isquemia cerebral (HERMAWATI *et al.*, 2020; LEE *et al.*, 2020). Estudos em culturas de células demonstraram efeito citoprotetor e neuroprotetor do ACG (GAO *et al.*, 2020; REBAI *et al.*, 2017; SHI *et al.*, 2020; GRAY *et al.*, 2014; TARAM *et al.*, 2016). Vários estudos indicaram que o consumo dietético de ACG reduz o risco de desenvolver doenças neurodegenerativas (HEITMAN *et al.*, 2017; TAJIK *et al.*, 2017).

1. 11. 2 Cafeína

A ingestão de bebidas ricas em cafeína para manter-se acordado e em estado de alerta é uma prática milenar e que continua a se proliferar mundialmente (CAPPELLETTI *et al.*, 2015). O café, a bebida mais popular após a água, é proveniente da planta *Coffea arabica*, e diariamente 1,6 bilhões de xícaras de café são consumidas em torno do mundo, em grande parte devido aos seus efeitos estimulantes (CAPPELLETTI *et al.*, 2015).

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) (Figura 10) é um alcaloide metilxantina pertencente ao grupo das xantinas, proveniente de partes de plantas nativas da América do Sul e Leste da Ásia enquanto a planta da qual o próprio café é feito é proveniente da Etiópia (CAPPELLETTI *et al.*, 2015; NCBI, 2022). É o psicoestimulante mais consumido no mundo, sendo a maior parte da cafeína consumida proveniente de fontes alimentares como café, chá e chocolate e refrigerantes (COSTA *et al.*, 2008; ARENDASH; CAO, 2010).

Figura 10 - Estrutura química da cafeína



A absorção completa da cafeína em humanos atinge 99% em cerca de 45 min após sua ingestão, ocorrendo no trato gastrointestinal (NEHLIG, 2018). Atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) e entra em todos os fluidos corporais, incluindo soro, leite, saliva e sêmen (CROZIER *et al.*, 2011). Após o consumo oral, o pico de concentração plasmática de cafeína é alcançado em 15 a 2 horas e sua meia-vida em adultos é tipicamente de 2,5 a 4,5 horas, mas está sujeita a grandes variações de uma pessoa para outra (NEHLIG, 2018). Ao consumir uma xícara de café coado, o teor médio de cafeína é geralmente de 90 mg por 230 ml (NEHLIG, 1999; MCCUSKER *et al.*, 2003)

A ingestão moderada de cafeína (3-5 xícaras/24 h) está associada à redução da fadiga, melhora cognitiva e melhor estado de alerta, levando a um melhor rendimento em tarefas psicomotoras que requerem resposta rápida (SMITH, 2002; VAN GELDER *et al.*, 2007). Além disso, estudos mostraram que a cafeína tem propriedades antioxidantes, anti-

inflamatórias (ULLAH *et al.*, 2015), anticancerígenas (GÖKCEN; ŞANLIER, 2019) bem como propriedades neuroprotetoras (ULLAH *et al.*, 2015).

O consumo de cafeína em humanos difere em uma ampla gama. Considera-se ingestão baixa de cafeína abaixo de 200 mg/dia (<2,86 mg/kg/dia), moderada entre 200 e 400 mg/dia (2,86–5,71 mg/kg/dia) e alta acima de 400 mg/dia (> 5,71 mg/kg/dia) (CAPPELLETTI *et al.*, 2015; OBOH *et al.*, 2017). Com base na taxa de conversão da área de superfície corporal, as doses administradas a humanos são convertidas em doses animais. Assim, com base nos cálculos, as doses correspondentes para ratos são as seguintes: baixa (<17,7 mg/kg/dia), moderada (17,7–35,4 mg/kg/dia) e alta (>35,4 mg/kg/dia). Doses equivalentes em camundongos abaixo de 35,1 mg/kg/dia são consideradas baixas, entre 35,1 e 70,3 mg/kg/dia como moderadas e acima de 70,3 mg/kg/dia como altas (OBOH *et al.*, 2017; REAGAN-SHAW *et al.*, 2008).

Abandonar a ingestão de cafeína após o consumo habitual pode levar a sintomas de abstinência, incluindo dores de cabeça, fadiga, diminuição do estado de alerta e humor deprimido, bem como sintomas semelhantes aos da gripe em alguns casos (JULIAON; GRIFFITHS, 2004). Esses sintomas geralmente atingem o pico 1 a 2 dias após a interrupção da ingestão de cafeína, com uma duração total de 2 a 9 dias, e podem ser reduzidos diminuindo gradualmente a dose de cafeína (JULIAON; GRIFFITHS, 2004). Em relatos de casos, alto consumo de energia bebidas e injeções, especialmente quando misturadas com álcool, também foram associadas a eventos adversos cardiovasculares, psicológicos e neurológicos, incluindo eventos fatais (EHLERS *et al.*, 2019).

É importante ressaltar que a cafeína, e seus metabólitos, são encontrados em diversos tecidos, devido à sua alta lipossolubilidade, como pulmão, tecido adiposo, fígado, rim e cérebro. Atravessa a BHE por difusão simples e afeta a atividade do sistema nervoso central (SNC) (CHE *et al.*, 2012). Kaplan e colaboradores (1989) descreveram uma relação linear entre a cafeína e seus metabólitos no cérebro e nas concentrações plasmáticas (KAPLAN *et al.*, 1989). Em todos estes órgãos, a cafeína consegue chegar e exercer os seus efeitos como antagonista dos receptores de adenosina A2A (DUARTE *et al.*, 2009).

A cafeína é estruturalmente relacionada à adenosina, funcionando como um antagonista competitivo de seus receptores, principalmente A1 e A2A, que possuem função *down*-reguladora de neurotransmissores como dopamina e glutamato, sendo este o mecanismo da ação inibidora na atividade do Sistema Nervoso Central por parte dos receptores de adenosina; a interação antagonista da cafeína com tais receptores, porém, reduzem a sua

função inibidora, fazendo com que a droga produza seu efeito estimulante (COSTA *et al.*, 2008; CAPPELLETTI *et al.*, 2015; CLARK; LANDOLT, 2017; NCBI, 2022).

A cafeína também possui efeitos psicotrópicos e anti-inflamatórios, sendo este último devido à inibição competitiva não-seletiva de fosfodiesterases, cuja inibição aumenta a concentração intracelular de Adenosina Monofosfato Cíclica (AMPC), ativa a cinase A, e inibe síntese de leucotrieno, que conjuntamente reduzem o processo inflamatório (CAPPELLETTI *et al.*, 2015; NCBI, 2022).

Este composto também melhora o desempenho em tarefas cognitivas e modula parâmetros antioxidantes no cérebro de indivíduos jovens (ABREU *et al.*, 2011; AOYAMA *et al.*, 2011). Um estudo com mulheres não fumantes demonstrou que a ingestão de cafeína estava associada a uma diminuição da perda neuronal no hipocampo (PERLAKI *et al.*, 2011).

Estudos também mostraram que a cafeína pode contribuir para o alívio da dor quando adicionada a agentes analgésicos comumente usados (DERRY, C.; DERRY, S.; 2014). Conforme esperado por seus efeitos sobre a fadiga, o consumo de cafeína no final do dia pode aumentar a latência do sono e reduzir a qualidade do sono (CLARK; LANDOLT, 2017). Além disso, a cafeína pode induzir ansiedade, particularmente em altas doses (>200 mg por ocasião ou >400 mg por dia) em pessoas sensíveis, incluindo aquelas com ansiedade ou transtornos bipolares (LARA, 2010).

Estudos metabólicos sugerem que a cafeína pode melhorar o balanço energético reduzindo o apetite e aumentando a taxa metabólica basal, bem como a termogênese induzida por alimentos (HARPAZ *et al.*, 2017). O consumo de café está associado a um risco ligeiramente reduzido de melanoma (MICEK *et al.*, 2018), câncer de pele não melanoma (CAINI *et al.*, 2017), câncer de mama (LAFRANCONI *et al.*, 2018) e câncer de próstata (XIA *et al.*, 2017). O consumo de café e cafeína também foi associado a riscos reduzidos de depressão e suicídio em vários estados nos Estados Unidos e na Europa, embora esses achados possam não se sustentar em pessoas que ingerem muito (≥ 8 xícaras por dia) (TANSKANEN *et al.*, 2000; LUCAS *et al.*, 2014).

O consumo de 2 a 5 xícaras padrão de café por dia foi associado à redução da mortalidade em estudos de coorte em todo o mundo (LOFTFIELD *et al.*, 2018; FREEDMAN *et al.*, 2012; TAMAKOSHI *et al.*, 2011) e em pessoas de ascendência europeia, afro-americana e asiática (PARK *et al.*, 2017). Vários estudos demonstram que o consumo de cafeína é associado a melhor execução cognitiva, redução de declínios cognitivos associados à idade, incluindo uma associação epidemiológica significativa entre o decréscimo no consumo

de cafeína durante os 20 anos antes do diagnóstico e o próprio diagnóstico de DA (MAIA; DE MENDONÇA, 2002; COSTA *et al.*, 2008; ARENDASH; CAO, 2010; GELBER *et al.*, 2011).

Existem uma grande variedade de indícios e evidências que sugerem que a cafeína é capaz de servir como um tratamento efetivo para diferentes doenças, incluindo DA e Doença de Parkinson (MAIA; DE MENDONÇA, 2002; COSTA *et al.*, 2008; ARENDASH; CAO, 2010; GELBER *et al.*, 2011; CAPPELLETTI *et al.*, 2015; LI, 2014).

A cafeína oferece neuroproteção significativa; estudos epidemiológicos mostraram que há uma redução da doença de Parkinson com o consumo de cafeína (ASCHERIO *et al.*, 2004; QI; LI, 2014; XU *et al.*, 2016) e a cafeína ou o consumo moderado de café diminuem o risco de doença de Parkinson (ASCHERIO *et al.*, 2001). Já foi evidenciado que o consumo crônico de cafeína em animais diminui o comprometimento da memória ocasionada pelo envelhecimento (GELBER *et al.*, 2011) ou DA (COSTA *et al.*, 2008; LARSSON; ORSINI, 2018). E estudos mostraram que a ingestão de cafeína (1 mg/mL) pode reverter o comprometimento cognitivo e diminuir os níveis do peptídeo A β em camundongos submetidos a administração icv do peptídeo A β (DALL'IGNA *et al.*, 2007).

Evidências experimentais, porém, estão em suporte ao uso de cafeína e outros antagonistas do receptor de adenosina para o tratamento de diversos sintomas associados a doenças neurodegenerativas, incluindo morte neuronal (CAPPELLETTI *et al.*, 2015). Outros fatores que participam da sua atividade neuroprotetora são as atividades anti-inflamatórias e antioxidantes da cafeína, além de servir como ativador mitocondrial e estimulador de atividade neuronal e utilização de glicose, havendo estudos que sugerem que o consumo de cafeína diminui o risco de Diabetes Tipo 2 (ARENDASH; CAO, 2010).

Particularmente, estudos utilizando camundongos transgênicos com mutação no gene codificador da APP, um modelo animal de DA, mostraram que a administração crônica de uma dose diária de 1,5 mg de cafeína (equivalente a 500 mg em humanos) reduziu os níveis de A β encefálicos e protegeu contra déficits de memória (ARENDASH *et al.*, 2006; CAO *et al.*, 2009). Em camundongos, a cafeína e antagonistas dos receptores de adenosina preveniram o acúmulo do peptídeo A β dentro e ao redor dos vasos sanguíneos cerebrais – condição que, se não tratada, resulta em déficit cognitivo (CUPION; ZABEL, 2013; GAHR *et al.*, 2013).

É importante salientar que o efeito benéfico da cafeína sobre a memória e o potencial efeito neuroprotetor obtido pelo o consumo regular de cafeína tem sido atribuído ao antagonismo dos receptores A₂A (CUNHA; AGOSTINHO, 2010; FERRÉ, 2008). Dessa forma, o antagonismo dos receptores A₂A mimetiza o efeito da cafeína sobre a preservação

da memória, conforme observado por estudos utilizando roedores idosos (LEITE *et al.*, 2011) e modelos animais de DA (CANAS *et al.*, 2009; DALL'IGNA *et al.*, 2007).

2 PERGUNTA NORTEADORA

Neste contexto, tendo em vista os inúmeros efeitos benéficos do café e seus componentes na saúde humana, este estudo visa investigar os efeitos neuroprotetores e/ou de neuroresgate do ácido clorogênico e cafeína utilizando o modelo de DAE pela injeção icv de STZ, possuindo a seguinte pergunta norteadora: O Ácido Clorogênico e a Cafeína são capazes de proteger contra o dano neuronal e déficits cognitivos de camundongos submetidos ao modelo de DAE induzido por STZ?

3 HIPÓTESES

Estudos tem demonstrado que o Ácido clorogênico e Cafeína possuem atividade antioxidante e anti-inflamatória, e protegem contra déficits cognitivos. Com isso, é possível que o Ácido clorogênico e Cafeína tenham efeito neuroprotetor evitando os danos neuronais e cognitivos causados pela ICV-STZ no modelo de DAE.

4 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Com o aumento da expectativa de vida, especialmente em países desenvolvidos, a prevalência de doenças neurodegenerativas vem aumentando rapidamente e as terapias atuais, ainda ineficientes, em sua maior parte, estão voltadas apenas para a diminuição da progressão dos sintomas e não para a prevenção ou tratamento destas doenças.

A Doença de Alzheimer Esporádica (DAE) é a causa mais comum de demência e impõe enormes custos emocionais, financeiros, e na saúde e bem-estar do paciente, sua família, e seus cuidadores custos que se tornam progressivamente severos com o desenvolvimento da doença, que atualmente não possui cura ou tratamento capaz de retardar o seu progresso. Por tais motivos, o estudo da DAE é contemporaneamente de grande importância, e sua relevância tende fortemente a se elevar com o passar do tempo, para o desenvolvimento de medicamentos e tratamentos baratos e eficazes é essencial para o suporte dos pacientes e seus familiares, bem como para o benefício da sociedade em geral.

Para uma melhor identificação de potenciais alvos terapêuticos tendo em foco essas doenças, como a DAE, é preciso entender melhor os mecanismos celulares e moleculares pelos quais essas patologias se desenvolvem.

A DAE certamente tem um início muito mais precoce, talvez com manifestações subclínicas, que ocorrem décadas antes do surgimento das alterações cognitivo-comportamentais da doença, com a evolução do quadro clínico. Estudos epidemiológicos têm fornecido evidências diretas de que o Diabetes Mellitus (DM) tipo 2 é um forte fator de risco para DA e o estado de resistência à insulina tem sido reconhecido por desempenhar um papel importante na fisiopatologia da DA.

A administração de STZ permite uma indução controlada da doença, o que significa que os pesquisadores podem determinar quando e como os primeiros sintomas da DA serão desencadeados. Isso é útil para estudar o desenvolvimento inicial da doença e seus primeiros sinais clínicos.

O Ácido clorogênico e a Cafeína possuem atividade antioxidante, anti-inflamatória, e protegem contra déficits cognitivos. Com isso, é possível que o ácido clorogênico e cafeína, tenham efeito neuroprotetor evitando os danos neuronais e cognitivos causados pela ICV-STZ nesse modelo de DAE.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito neuroprotetor do ácido clorogênico e da cafeína sobre a neurotoxicidade induzida pela ICV-STZ em camundongos submetidos ao modelo experimental de DAE.

5.2 Objetivos Específicos

Estudos *in vivo*:

Em animais submetidos ao modelo experimental de DAE induzida por ICV-STZ, avaliar o efeito neuroprotetor do ácido clorogênico e da cafeína sobre:

- ✓ A atividade locomotora e ansiedade;
- ✓ A memória (de trabalho, de reconhecimento, aversiva e espacial);
- ✓ Alterações oxidativas;
- ✓ A viabilidade neuronal;
- ✓ Resposta ao fator de crescimento neuronal;
- ✓ A resposta neuroinflamatória (medir ativação microglial e astrogial);

Estudos *in Silico*:

Avaliar a interação molecular entre o ácido clorogênico e cafeína com os alvos AChE e IRS-1, através dos estudos com *docking* molecular.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos adultos da estirpe *Swiss*, machos, com peso compreendido entre 25-35 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e transferidos para o Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas apropriadas, forradas com raspa de madeira à temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e com ciclo de claro/escuro de 12h/12h e alimentados com ração padrão e água à vontade.

No que se refere aos cuidados com os animais, todos os procedimentos realizados no estudo seguiram os princípios éticos da experimentação animal, estabelecidos pelo Conselho Nacional de controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFC) da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob o número de registro 8904290319 (Anexo A).

6.2 Drogas

As seguintes substâncias foram utilizadas: Estreptozotocina (SIGMA-USA), Ácido Clorogênico (SIGMA-USA), Cafeína (SIGMA-USA), Quetamina (König, Argentina), Xilazina (König, Argentina). Os demais reagentes foram de grau analítico.

6.3 Modelo de Doença de Alzheimer Esporádica (DAE) induzido por Estreptozotocina (STZ)

Os procedimentos de lesão foram realizados através do procedimento de indução estereotáxica. Os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg intraperitoneal i.p.) e quetamina (100 mg/kg i.p.) e posicionados no aparelho estereotáxico (Stoelting®). A desinfecção da pele foi realizada com aplicação de iodo-polivinilpirrolidona (Povidone, Vick Pharma, São Paulo, Brasil). Foi realizada uma incisão sagital mediana de aproximadamente 1,5 cm de comprimento com um bisturi, no alto do crânio, expondo-se as suturas ósseas cranianas, com o objetivo de localizar o *bregma*.

Os orifícios foram perfurados no crânio em ambos os lados sobre os ventrículos laterais usando as seguintes coordenadas: 0,5 mm posterior ao *bregma*, 1,1 mm lateral à

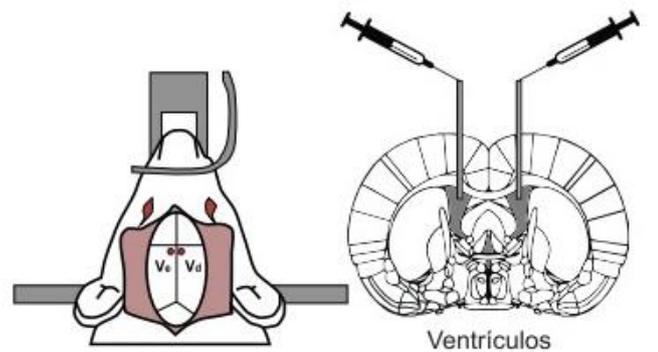
sutura sagital e 2,8 mm abaixo a superfície do cérebro (PAXIONS; FRANKLIN, 2004) (Tabela 1). Esse modelo experimental de lesão foi proposto por Lannert e Hoyer (1998). Foram realizadas perfurações nos crânios dos animais com uma broca de baixa rotação (Dremel) em cada marcação, permitindo entrada da seringa *Hamilton* com o STZ (3 mg/kg) sendo injetado icv bilateralmente no dia 1 e 3 do experimento, em ambos ventrículos, sendo infundido 1,5 μ l (45 μ g/1,5 μ l) em cada hemisfério, sendo utilizada a quantidade igual para os animais na faixa de peso de 25-35 g (SHARMA; GUPTA, 2001) (FIGURA 11).

Tabela 1 – Sítios das micro injeções bilaterais de STZ nos ventrículos laterais

Coordenadas	Ponto 1 (ventriculo E)	Ponto 2 (ventriculo D)
Antero-posterior	- 0,5	- 0,5
Médio-lateral	- 1,1	+ 1,1
Ventral	+ 2,8	+ 2,8

Coordenadas descritas por Paxinos e Franklin, 2004

Figura 11 - Esquema das seções de micro injeções.



Fonte: (ESTEVES, 2016)

À esquerda, mostrando as regiões do crânio onde foram realizados os furos para ter acesso aos ventrículos direito e esquerdo, e à direita mostrando o corte coronal da região onde foram realizadas as injeções de STZ.

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 animais foram suturados no local do corte com fio cirúrgico de algodão (AP 0,4 15x45 cm) e desinfetados com iodo povidine. Os animais do grupo controle foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, mas não receberam a neurotoxina STZ, foi introduzido somente a agulha nas mesmas coordenadas estereotáxicas, seguido de infusão de fluido espinal cerebral

artificial (aCSF) estéril (veículo, solução de NaCl 125; KCl 2,5; NaH₂PO₄ 5; CaCl₂ 1,2; MgCl₂ 1; concentração em mM:) (RAZA *et al.*, 2023).

6.4 Protocolo Experimental

O tratamento com o Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) ou veículo (água) foi feito por via oral (v.o.), por gavagem, duas horas após os procedimentos de indução e diariamente durante os 25 (vinte e cinco) dias que seguem após o segundo procedimento de indução.

As doses Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) foram utilizadas baseados em estudos de Stefanello (2016), que demonstrou que os compostos nessas doses foram capazes de modular a atividade de enzimas do sistema purinérgico e contribuir com a prevenção das complicações decorrentes da hiperglicemia, além de contribuir também para o combate do estresse oxidativo presente no diabetes mellitus, no modelo induzido por estreptozotocina (STEFANELLO, 2016) e em estudos de Kazuchika Nishitsuji e colaboradores (2018), entretanto, neste estudo as doses são dadas em porcentagens das concentrações dos compostos em relação ao Café, sendo o teor de cafeína ou ácido clorogênico correspondente à 0,5% de café (NISHITSUJI *et al.*, 2018). A dose de Cafeína (15 mg/kg v.o.) correspondente à ingestão de aproximadamente três xícaras de café em humanos.

Foram utilizados um total de 120 animais divididos em 6 grupos experimentais, cada um com 20 animais, de acordo com a Tabela 2. Os animais de cada grupo foram divididos em 2 subgrupos de 10 (dez) animais. Os animais do primeiro subgrupo foram submetidos a testes para avaliar a atividade locomotora (teste do campo aberto), avaliação de memória (teste do labirinto em Y, teste do reconhecimento de objetos e teste da esQUIVA passiva) e avaliação da ansiedade (labirinto em cruz elevado). Os animais do segundo subgrupo foram submetidos aos testes para avaliar a atividade locomotora (teste do campo aberto) e avaliação de memória espacial (teste do labirinto aquático). Os testes empregados foram realizados de acordo com o desenho experimental abaixo (FIGURA 12). Os testes de comportamento foram realizados 22 (vinte e dois) dias após a segunda ICV-STZ ou de aCSF: testes de atividade locomotora (teste de campo aberto), avaliação de memória (teste do labirinto em Y, teste de reconhecimento de objetos; teste de esQUIVA passiva e teste do labirinto aquático) e avaliação da ansiedade por meio do labirinto em cruz elevado.

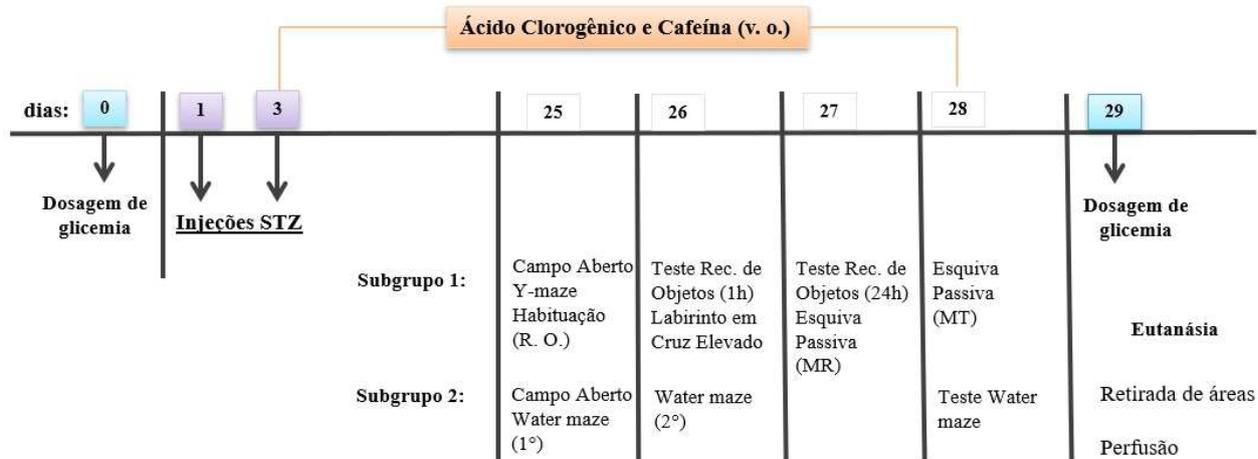
Após os testes de comportamento, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para a retirada das áreas cerebrais (córtex e hipocampo) para realização das análises do estresse oxidativo (n = 6) (TBARS e Nitrito). Para as análises imunohistoquímicas (n = 5-6), os animais foram anestesiados e perfundidos com paraformaldeído a 4% em PBS (tampão fosfato 0,1 M contendo salina 0,9 %, pH 7,4). Os cérebros foram removidos, fixados em formol tamponado a 10% por 24 h e posteriormente crioprotetidos em sacarose a 30% em PBS a 4° C, posteriormente foram feitos os cortes histológicos no criostato (10µm) e feita a montagem em lâminas silanizadas para análise da viabilidade celular (Cresil Violeta) e imunohistoquímicas para neuroinflamação por meio das marcações para Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP) e Iba-1 (uma proteína que é expressa em grande número em células de micróglia e macrófagos) e para a neurotrofina Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF), fator de crescimento celular envolvido em processos de regulação e manutenção do sistema nervoso central e periférico.

Estudos *in silico*, *docking* molecular, foram feitos para avaliar a afinidade de ligação e as interações moleculares entre as estruturas de ácido clorogênico e cafeína em relação as estruturas de AChE e IRS-1.

Tabela 2 - Protocolo experimental

Grupo	Tratamento		Número de animais
	Icv	v. o.	
1	aCSF	+ Veículo (água)	20
2	aCSF	+ ACG (5 mg/kg)	20
3	aCSF	+ Cafeína (15 mg/kg)	20
4	STZ (3 mg/kg)	+ Veículo (água)	20
5	STZ (3 mg/kg)	+ ACG (5 mg/kg)	20
6	STZ (3 mg/kg)	+ Cafeína (15 mg/kg)	20

Figura 12 - Desenho experimental mostrando a sequência dos testes comportamentais realizados nos subgrupos de animais.



Fonte: arquivo pessoal

6. 5 Dosagem da glicemia

A dosagem da glicemia foi realizada em todos os animais, sendo feita sem restrição alimentar, para confirmar que os animais não estavam diabéticos. As dosagens foram feitas imediatamente antes dos procedimentos de indução e 26 dias após as injeções ICV-STZ. Com o auxílio de uma tesoura cirúrgica estéril, uma gota de sangue foi obtida através da perfuração da ponta da cauda dos animais. Essa amostra de sangue, foi aplicada sobre a fita teste usada para leitura no medidor de glicose (On Call® Plus), sendo os resultados obtidos em mg/dL. Camundongos com glicemia de jejum superiores a 200 mg/dL e peso corporal acima de 55 g são classificados como diabéticos (TABAK *et al.*, 2012).

6. 6 Testes comportamentais

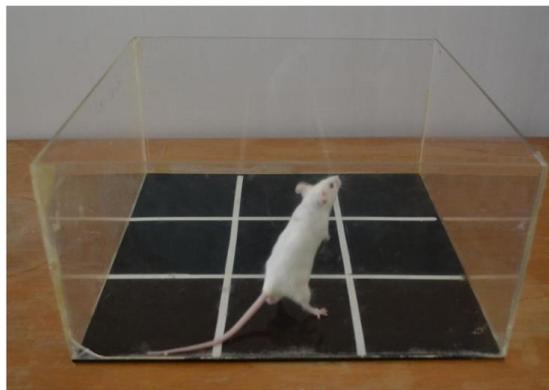
Todos os testes comportamentais foram feitos em condições de luz vermelha de baixa intensidade, com temperatura e umidade controladas. Exceto no labirinto aquático de Morris, os aparelhos foram limpos com etanol 20% entre cada animal. Os testes comportamentais foram captados em vídeo através de uma câmera USB e analisado em tempo real, ou posteriormente, com o software ANYmaze (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA).

6. 6. 1 Avaliação da Atividade Locomotora - Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto foi originalmente descrito por Hall (1934), para analisar o estado emocional em ratos e camundongos. O teste utilizado neste trabalho foi baseado no modelo de Broadhurst (1957) e foi utilizado com o intuito de avaliar a atividade locomotora e o comportamento exploratório do animal, pois essa atividade medida pela distância que um animal percorre reflete a exploração a um contexto novo.

O campo aberto consiste de uma arena quadrada (30 x 30 x 15 cm) de acrílico com o piso preto dividido em nove quadrantes iguais (FIGURA 13). No teste, o animal foi colocado na arena e deixado para explorar o ambiente por 5 minutos. Durante este período, foram registrados por meio do software *ANY-maze* (versão 4, USA): a distância percorrida, a velocidade média, o número de quadrantes atravessados pelo animal (número de cruzamentos) e o número de vezes que o animal se levantou para explorar o ambiente (explorações verticais), mantendo-se apenas pelas patas traseiras, caracterizando o comportamento exploratório do tipo *rearings*. O ambiente foi iluminado com luz vermelha e a arena foi limpa com álcool a 20% após cada animal ser retirado, para evitar que o cheiro de urina e fezes interferisse no teste.

Figura 13 - Arena do Campo Aberto



Fonte: (Laboratório de Neurociências e Comportamento - LNC)

6. 6. 2 Avaliação sobre a Memória

6. 6. 2. 1 Avaliação da memória de trabalho - Teste Labirinto em Y (Y-maze)

Neste teste, avalia-se a memória operacional ou de trabalho (curto-prazo) visuoespacial, que tem como principal área envolvida, o córtex pré-frontal (SARTER *et al.*, 1988). O labirinto em Y é composto por 3 braços de madeira com 16 cm de altura, 5 cm de largura e 40 cm de comprimento (FIGURA 14). Neste teste, o animal foi colocado em um dos braços e foi feita a contagem das alterações espontâneas as entradas nos outros braços durante 8 (oito) minutos. Os animais controles apresentam forte tendência de alternar a entrada nos diferentes ambientes sem repetição.

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 alterações espontâneas. Os dados foram expressos como a porcentagem de alternância nos braços sem repetição.

O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos grupos controle, indicando que os animais podem lembrar em qual braço eles entraram por último (LALONDE, 2002). É considerado como número de acertos o número de entradas nos 3 braços sem repetição. O resultado é expresso em porcentagem e obtido através da seguinte fórmula matemática:

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

Figura 14 - Labirinto em Y



Fonte: (LNC)

6. 6. 2. 2 Avaliação da memória de reconhecimento – Teste do Reconhecimento de Objetos

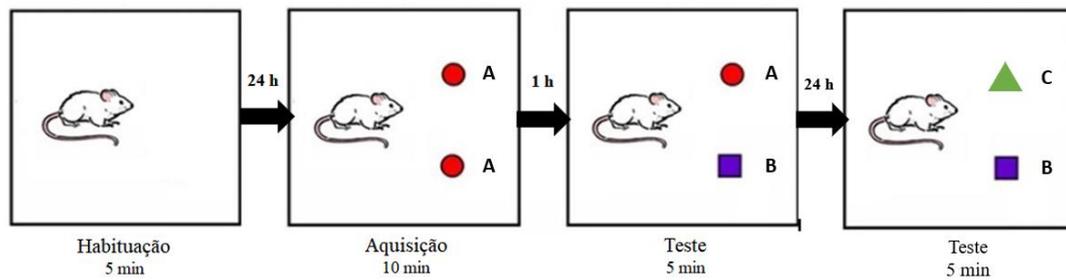
Quando roedores são apresentados a objetos familiares e novos, eles passam uma maior porção do tempo explorando o novo objeto. O teste de reconhecimento de objetos é baseado nessa tendência natural dos animais buscarem o novo (ENNACEUR; DELACOUR, 1988) (FIGURA 15). A tarefa do reconhecimento de objeto está intimamente relacionada com o bom funcionamento do hipocampo, bem como a codificação, consolidação e recuperação da memória que, por sua vez, está relacionada com o córtex perirrinal (recebe informações de áreas corticais visuais, olfatórias e somatossensoriais, envolvidos com a interpretação de estímulos) (WINTERS *et al.*, 2008; WIN-SHWE, 2013).

Os animais foram ambientados na arena de campo aberto 24 h antes da realização do teste. O teste de reconhecimento de objetos foi realizado 23 dias após a segunda injeção de STZ. O teste foi realizado na arena do campo aberto, onde dois objetos idênticos, colocados em lados opostos nos cantos da arena. O animal foi colocado no quadrante do meio virado para a parede, no lado oposto aos objetos.

O teste foi feito em três sessões. Na primeira sessão, o animal foi deixado na arena de campo aberto contendo os dois objetos idênticos (A e A) para livre exploração por 10 min. Na segunda sessão, realizada uma hora depois, o objeto situado à direita (A) foi substituído por um novo objeto (B), e foi medido o tempo de exploração em cada objeto (antigo e novo) durante 5 minutos (memória de curta duração). Na terceira sessão, realizada 24 horas depois, o objeto familiar da primeira sessão (A) foi substituído por um novo objeto (C), e foi medido o tempo de exploração em cada objeto (antigo e novo) durante 5 minutos (memória de longa duração).

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 as sessões dos testes. Os seguintes comportamentos foram considerados como exploração dos objetos: farejar, lambe ou tocar o objeto com o nariz ou com as pernas da frente ou direcionando o nariz para o objeto a uma distância ≤ 1 cm.

Figura 15 - Ilustração representando a metodologia do teste de reconhecimento de objetos.



Fonte: (Desenho adaptado de Kate Feilhaber, Knowing Neurons, 2015)

6. 6. 2. 3 Avaliação da Memória Aversiva – Teste da Esquiva Passiva

Este teste foi baseado no método de De ONBLE e colaboradores (1986) e nos permite avaliar as memórias de curta e longa duração (recente e tardia), assim como a memória com componente aversivo. O teste de esquiva passiva usa a 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.

A esquiva passiva é um dos testes mais utilizados para avaliar a memória e o aprendizado em animais (HUANG *et al.*, 2012). Esse modelo não depende apenas de estruturas cerebrais como o hipocampo, mas de outros, como córtex entorrinal e amígdala (BLANK *et al.*, 2014), todos afetados pelo processo neurodegenerativo na DA (SINGH *et al.*, 2014).

Após 24 dias do procedimento de indução com STZ, os animais foram habituados ao aparelho de esquiva passiva (*Insight* LTDA). O aparelho consiste de uma caixa de acrílico (48 x 22 x 22 cm), tendo este o piso eletrificado e uma plataforma não eletrificada (FIGURA 16). O animal foi colocado na plataforma e deixado para ambientação no aparelho durante um 1 minuto. Após 30 segundos, o animal foi colocado novamente na plataforma. Visto que a tendência do animal é explorar o ambiente, ao descer da plataforma, ele recebe um choque de 0,5 mA, durante 1 segundo, com o tempo de latência para descer sendo registrado, até um máximo de 300 s (treino). Os animais que não desceram da plataforma foram posicionados sob a parte gradeada e levaram o mesmo choque após os 300 s de treino.

O animal foi retirado e, após 15 minutos, colocado novamente na plataforma, sendo registrada a latência de descida (memória recente). A aprendizagem foi testada após 24 horas (memória tardia), mas nessa fase, os animais não levaram choque.

Figura 16 - Aparelho de Esquiva Passiva



Fonte: (Insight LTDA.)

6. 6. 2. 4 Avaliação da memória espacial - Teste do Labirinto Aquático

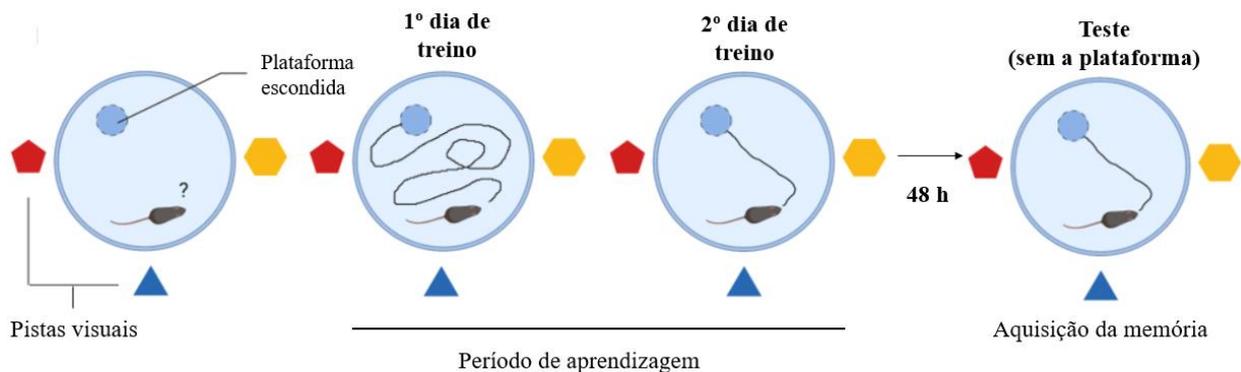
Com o objetivo de avaliar o aprendizado e a memória (longo-prazo) visuoespacial, foi utilizado o labirinto aquático com pistas de *Morris* (*Water maze*) (FIGURA 17) (MORRIS, 1984). O *Morris Water Maze* consiste em uma grande piscina circular de água opaca. Uma plataforma é colocada na piscina logo abaixo da superfície da água para que o camundongo não consiga vê-la. Os ratos sempre tentarão encontrar a plataforma o mais rápido possível. As pistas nas paredes ao redor da piscina ajudam os camundongos a se orientarem dentro da piscina e são fundamentais para formar uma percepção global de localização que depende, principalmente, do hipocampo (MORRIS, 1984; KANG *et al.*, 2017; YING *et al.*, 2018). (FIGURA 17).

O animal foi colocado de forma aleatória em uma piscina circular (90 cm de diâmetro e 60 cm de profundidade) contendo água (até 30 cm de altura) com tinta preta não tóxica à 26°C, dividida espacialmente em quatro quadrantes, devendo encontrar uma plataforma (7cm de diâmetro) submersa 2cm da altura da água. 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, durante dois dias (aprendizagem), para cada animal, com intervalos de 30s entre os treinos e 48 h 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 em 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 quadrante e o local exato da plataforma.

A primeira vez que um camundongo nada na piscina (FIGURA 17), o camundongo tende a nadar sem rumo até encontrar a plataforma escondida. A cada treino feito na piscina, o camundongo ficará habituado em achar a plataforma. Usando as formas na parede para ajudar a identificar onde eles estão na piscina, o camundongo acabará aprendendo e memorizando a localização da plataforma.

Figura 17 - Labirinto aquático com pistas



Fonte: (Adaptado de SHEELER; NITSCHKE, 2021)

6. 6. 2. 5 Avaliação da ansiedade - Labirinto em cruz elevado

O Labirinto em cruz elevado (LCE) é um método que avalia as respostas de ansiedade em roedores. Descrito pela primeira vez por Pellow e colaboradores (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 teste LCE foi realizado para avaliar uma possível resposta ansiogênica nos animais após o tratamento com o ACG e a cafeína.

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 18). 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: (Entradas: [aberto/total (aberto + fechado)] x 100, a porcentagem de tempo nos braços abertos (tempo nos braços abertos / aberto + fechado) x 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 (WALF; FRYE, 2007).

Figura 18 - Labirinto em cruz elevado



Fonte: *Stoelting Co.*

6. 7 Avaliações bioquímicas - Estresse Oxidativo

6. 7. 1 Determinação da peroxidação lipídica

A atividade antioxidante foi medida pela dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (DRAPER; HADELY, 1990), um indicador de peroxidação lipídica. No dia do ensaio, 60 μ L do homogenato (10% em tampão fosfato) de córtex e hipocampo foi introduzido em tubo de ensaio e centrifugado a 1200 rotações por minuto (rpm) 4°C por 30 minutos. Após a centrifugação, 100 μ L de ácido perclórico a 35% foi adicionado para interromper a peroxidação e, centrifugado novamente a 5000 rpm 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e a este foi adicionado 50 μ l 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 malondialdeído (MDA) padrão e os resultados foram expressos em concentração (µM).

6. 7. 2 Determinação da concentração de nitrito/nitrato

Nesse ensaio o reativo de Griess (N-1-naftiletilenodiamina a 0,1% em água destilada, sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%, na proporção 1:1) revela a presença de nitrito/nitrato (NO₂/NO₃) 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).

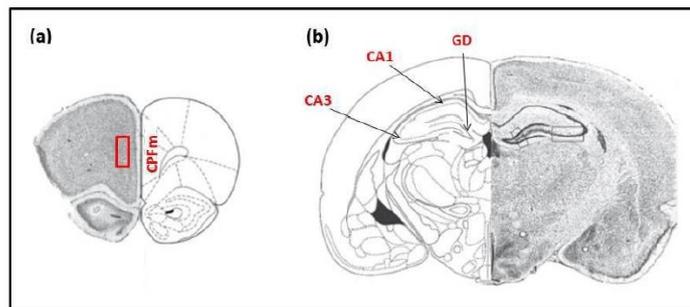
Para realização do ensaio, os homogenatos (10% em tampão fosfato) de córtex e no hipocampo foram centrifugados a 1.2000 rpm por 15 min a 4°C. 100 µL de cada sobrenadante foi adicionado a 100 µL do reagente de Griess. Para o branco, foi utilizado 100 µL do tampão fosfato e 100 µL reagente de Griess. Após 10 minutos, foi feita a leitura das absorbâncias em 540nm. 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.

6. 8 Análise histoquímica

Vinte e oito dias após as injeções ICV-STZ e realização dos testes comportamentais, após a anestesia, os animais foram perfundidos através do coração, pelo ventrículo esquerdo com salina gelada (8°-10°C), seguido de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato-salino (PBS). Os cérebros foram removidos e pós-fixados com formol tamponado por 24 (vinte e quatro) horas. Após esse período, foram armazenados em solução crioprotetora de sacarose a 30% (4°C), até o momento da microtomia (cortes histológicos). 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). O tecido foi cortado no criostato e montado em lâminas silanizadas, sendo utilizadas

fatias representativas do córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo (FIGURA 19). Os cortes histológicos na espessura de 10 μ m foram então corados pela técnica de Violeta de Cresil, para a verificação da viabilidade neuronal, e foram feitas imunohistoquímicas para marcação de BDNF, GFAP e Iba-1.

Figura 19 - Representação do cérebro de camundongo com ilustração esquemática das subdivisões do CPF e do Hipocampo.



Fonte: (Adaptado de CODAGONNE *et al.*, 2015).

(a) Cortex pré-frontal medial destacado em vermelho. (b) Áreas hipocâmpais Corno de Amon 1 e 3 (CA1, CA3) e Giro denteado (GD) do cérebro de camundongo

6. 8. 1 Avaliação da viabilidade celular através do Violeta de Cresil

Neste estudo, a viabilidade celular foi avaliada usando a coloração de cresil-violeta, que destaca os corpúsculos de Nissl (que correspondem ao retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e aos ribossomos livres) no citoplasma de neurônios viáveis. A coloração de cresil-violeta é um método histológico comumente usado para identificar danos celulares no sistema nervoso e avaliar a viabilidade celular. Células danificadas exibem características como um corpo celular encolhido com picnose (condensação do núcleo) (SCORZA *et al.*, 2011; ALVAREZ-BUYLLA; LING; KIRN, 1990).

As lâminas com os cortes cerebrais de córtex pré-frontal e hipocampo foram mergulhados em água destilada durante um minuto. Posteriormente, foram incubados na solução de cresil-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%). Por fim, foram mergulhadas em xilol e montadas com *entellan* (Merck, Alemanha). É importante salientar que todas as lâminas contendo as fatias foram marcadas juntas, para evitar possíveis alterações de marcação.

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, sendo três campos de cada área em cada fatia, aleatoriamente, e a quantificação dos neurônios corados foi realizada em todas as imagens utilizando o software *Image J* (NIH, Bethesda, MD, EUA) com um *grid type* de 1000000 pixels² de área, plotado de forma aleatória na imagem pelo programa. 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 média do 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).

6. 8. 2 Imunohistoquímicas para BDNF, GFAP e Iba-1

A avaliação da atividade de neurotrofina foi feita pela imunomarcção com o anticorpo para BDNF, fator de crescimento neuronal envolvido em processos de regulação e manutenção do sistema nervoso central. A avaliação da ativação de astrócitos (astroglíose) foi feita pela imunomarcção com o anticorpo para GFAP. Para a verificação da presença e ativação das micróglia (microglíose) foi empregado o marcador de micróglia Iba-1. A marcação para BDNF, GFAP e Iba-1 foi realizada em fatias (10 µm de espessura e espaçamento de 50 µm) representativas do córtex pré-frontal e hipocampo. É importante salientar que todas as lâminas contendo as fatias foram marcadas juntas, para evitar possíveis alterações de marcação (FIGURA 20).

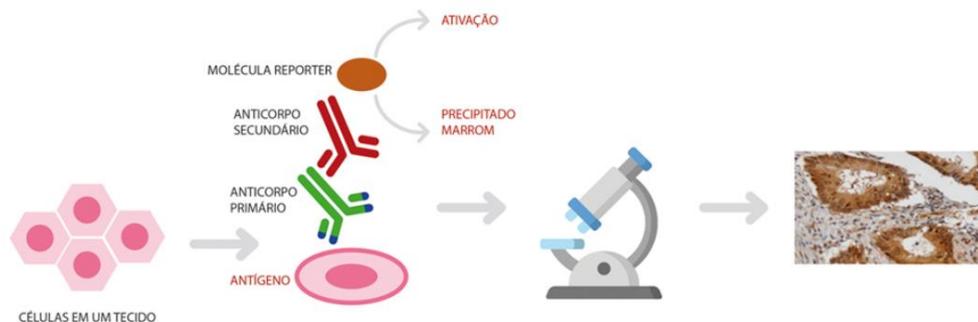
As fatias de córtex pré-frontal e hipocampo foram lavadas 3 vezes por 5 min em PBS, sendo o bloqueio da peroxidase endógena feito com H₂O₂ 1,05% em metanol 10% em PBS, durante 40 minutos a temperatura ambiente (TA). Após essa etapa, foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em PBS e feito o bloqueio das proteínas endógenas com uma solução bloqueadora (10% de soro de cavalo e 1% de Triton X-100 em PBS) por 2 horas a TA. Após isso, as fatias foram incubadas nos anticorpos, diluídos em PBS com 0,25% de Triton-X100 5% de soro de cavalo. por 48 h: anticorpo primário anti-BDNF (1:200 µL); anticorpo primário anti-GFAP (*rabbit*, 1:200 µL, Sigma); e anticorpo primário anti-Iba-1 diluído na solução bloqueadora (*rabbit polyclonal*, 1:300 µL; WAKO, Japão) *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 2 horas 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 de cada animal e três áreas em cada fatia, aleatoriamente, e a quantificação semi-quantitativa 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, sendo utilizados 5 a 6 animais por grupo, e foi calculada a média dos valores obtidos para o grupo controle, e os demais valores foram calculados como percentagem desse valor.

Figura 20 - Representação esquemática do princípio geral da técnica de imuno-histoquímica



Fonte: <https://www.argospatologia.com.br/imunohistoquimica/>

6.9 Docking Molecular

A energia envolvida na ligação entre o ligante (fármaco) e o sítio ativo proteico é calculada a partir das ligações não covalentes entre os grupos funcionais presentes na molécula bioativa e no sítio ativo proteico (receptor) (ANDREI *et al.*, 2012). A técnica de ancoragem molecular gera estimativas de energias de ligação entre o ligante e a proteína alvo (RODRIGUES *et al.*, 2012).

No *docking* se avalia diferentes conformações espaciais do ligante, sendo possível identificar qual é a mais provável conformação do ligante ao acoplar no sítio ativo da proteína alvo. Para cada conformação se obtêm as respectivas energias livres de ligação entre o ligante

e o alvo, onde a menor energia será considerada a mais provável para justificar a conformação da interação (KITCHEN *et al.*, 2004).

Dessa forma, foram realizados estudos *in silico*, *docking* molecular, por meio de uma parceria com o Laboratório de Toxinologia, do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC). As estruturas de Ácido Clorogênico e Cafeína foram modeladas 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).

6. 10 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo *Software GraphPad Prism* 6.01 (GraphPad Software, Inc.) e todos os dados foram expressos como média \pm EPM (erro padrão médio). Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade D'Agostino e Pearson e teste de normalidade Shapiro Wilk para verificar se dados apresentam distribuição normal, sendo determinado o uso de testes paramétricos ou não paramétricos para a avaliação estatística dos resultados.

Como todos os resultados apresentaram uma distribuição normal, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni como teste *post-hoc*, para comparações dentro dos grupos. Em todos os testes o critério de significância utilizado foi de $P < 0,05$.

7 RESULTADOS

7. 1 Efeitos do Ácido Clorogênico e Cafeína sobre a atividade locomotora (Teste do Campo aberto) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.

Os resultados obtidos no teste do campo aberto demonstraram que não houve nenhuma alteração significativa entre os grupos em relação à distância percorrida (FIGURA 21A), velocidade média (FIGURA 21B) e no número de *crossings* e *rearings* (FIGURA 21C) (Tabela 3).

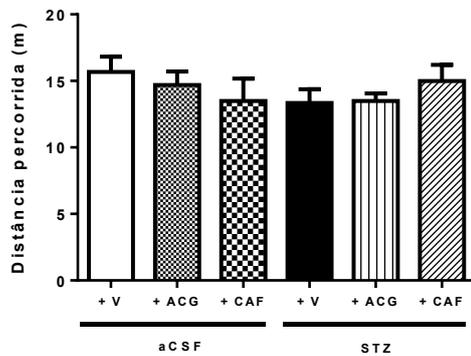
Tabela 3 - O efeito do tratamento com o Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) na distância percorrida, velocidade média e no número de *crossings* e *rearings*, registrados por meio do software *ANY-maze* (versão 4, USA), em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ no teste do campo aberto.

Grupos	Distância percorrida	Velocidade média	<i>Crossings</i>	<i>Rearings</i>
aCSF + V	15,68 ± 1,150	0,050 ± 0,0032	184,8 ± 5,75	10,30 ± 2,65
aCSF + ACG	14,69 ± 1,01	0,049 ± 0,0033	193,6 ± 10,46	7,80 ± 2,30
aCSF + CAF	13,48 ± 1,68	0,045 ± 0,005	178,8 ± 21,77	8,77 ± 1,44
STZ + V	13,34 ± 1,03	0,044 ± 0,003	161,2 ± 8,187	10,10 ± 1,66
STZ + ACG	13,50 ± 0,57	0,045 ± 0,001	190,4 ± 10,62	7,77 ± 1,35
STZ + CAF	14,99 ± 1,22	0,050 ± 0,004	185,5 ± 11,47	4,88 ± 0,78

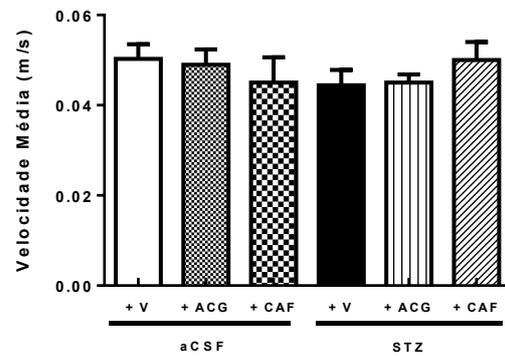
Fonte: dados da pesquisa

Figura 21 - Efeito do Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) na atividade locomotora de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ no teste do campo aberto.

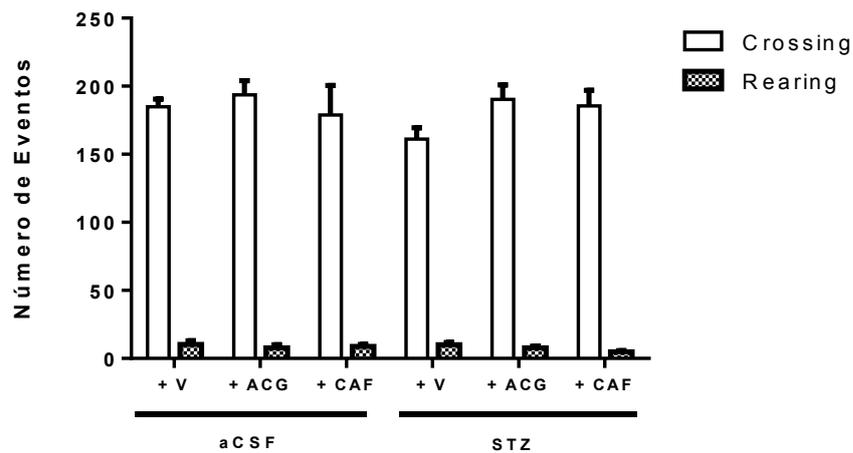
A



B



C

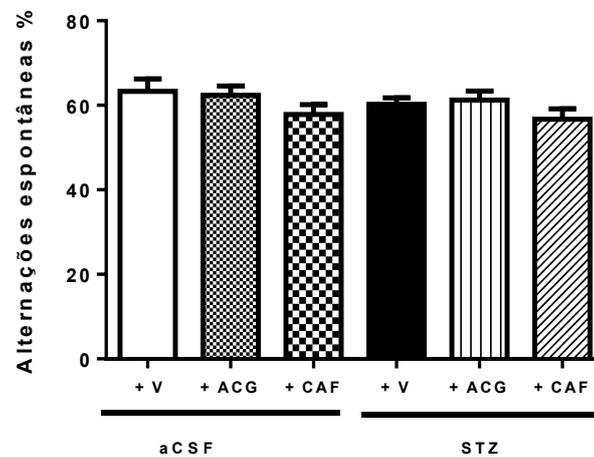


Os animais ($n = 10$ animais/grupo) foram tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) durante 26 dias, sendo a distância percorrida (A), velocidade média (B) e o número de crossings e rearings (C) avaliados pelo software *ANYmaze* (Stoelting Co., USA) por 5 minutos, 12 dias após a ICV-STZ. Os valores estão representados como média \pm EPM. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); ACG (Ácido Clorogênico); CAF (Cafeína).

7. 2 Efeitos do Ácido Clorogênico e Cafeína sobre o déficit na memória de trabalho (Teste do Labirinto em Y) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.

Na avaliação da memória de trabalho através do teste do labirinto em Y não foi observado nenhuma alteração significativa entre os grupos em relação a porcentagem de alternâncias espontâneas (FIGURA 22).

Figura 22 - Efeito do Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) sobre a memória de trabalho em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.



Os animais (n = 10 animais/grupo) foram tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) durante 26 dias, sendo o número de alternações espontâneas contados durante 8 minutos, 22 dias após a ICV-STZ. Os valores estão representados como média \pm EPM. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); ACG (Ácido Clorogênico); CAF (Cafeína).

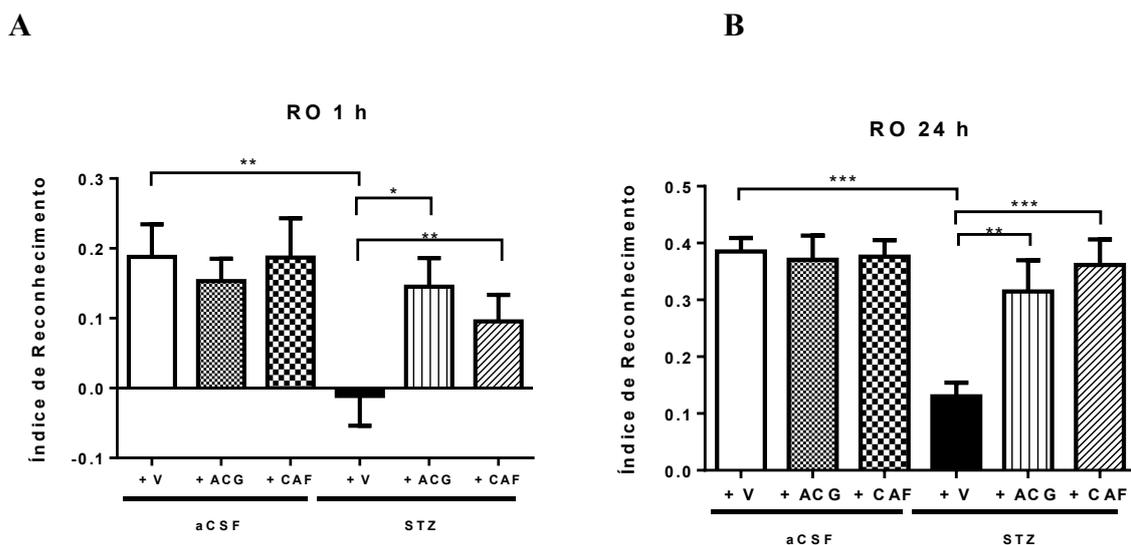
7. 3 Efeitos do Ácido Clorogênico e Cafeína sobre o déficit na memória de reconhecimento (Teste de Reconhecimento de Objetos) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.

Na avaliação do índice de reconhecimento através do teste de reconhecimento de objetos, os animais submetidos às injeções ICV-STZ apresentaram déficits na habilidade de reconhecer um novo objeto na exposição após 1 hora (aCSF: $0,18 \pm 0,04$; STZ: $-0,01 \pm 0,04$, $P < 0,01$) e na exposição após 24 horas (aCSF: $0,38 \pm 0,02$; STZ: $0,13 \pm 0,02$, $P < 0,01$) quando comparados aos animais do grupo aCSF, apresentando menor índice de reconhecimento.

O tratamento com o ACG promoveu uma melhora significativa no índice de reconhecimento do objeto nas exposições após 1 hora (STZ + ACG: $0,14 \pm 0,04$, $P < 0,05$) e 24 horas (STZ + ACG: $0,31 \pm 0,05$, $P < 0,05$) (FIGURA 23A e 23B).

O tratamento com a Cafeína promoveu uma melhora significativa no índice de reconhecimento do objeto nas exposições após 1 hora (STZ + CAF: $0,09 \pm 0,03$, $P < 0,05$) e 24 horas (STZ + CAF: $0,36 \pm 0,04$, $P < 0,05$) (FIGURA 23A e 23B).

Figura 23 – Efeito do Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) sobre a memória de reconhecimento em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.



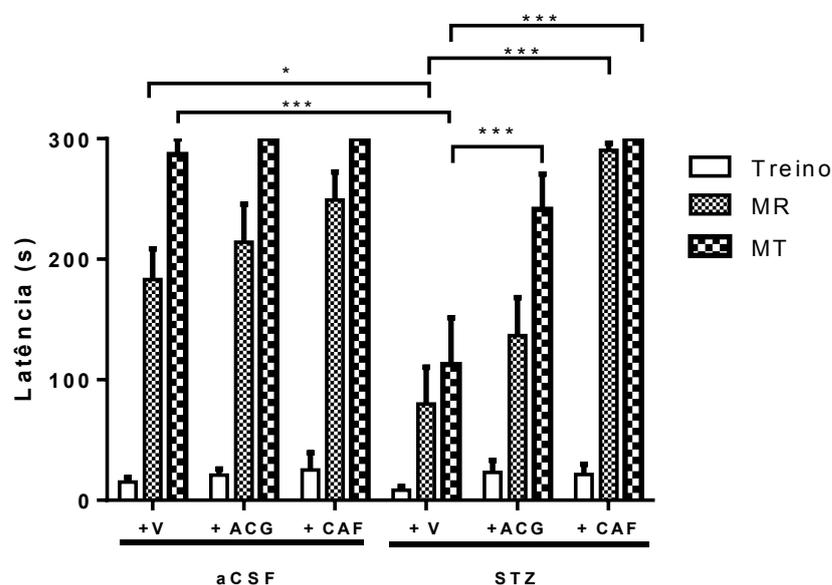
Os animais foram tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) durante 26 dias, sendo o índice de reconhecimento analisado 23 dias após a ICV-STZ, 1 h e 24 h após a apresentação dos objetos (n = 10 animais/grupo). Os valores estão representados como média ± EPM. A) Reconhecimento de objetos após 1 h. B) Reconhecimento de objetos após 24 h. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0001$. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo – água destilada v.o.); STZ (Estreptozotocina); ACG (ácido clorogênico); CAF (Cafeína).

7. 4 Efeitos do Ácido Clorogênico e Cafeína sobre a memória aversiva (Teste da Esquiva Passiva) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.

Na avaliação da memória aversiva através do teste da esquiva passiva, os animais submetidos às injeções ICV-STZ apresentaram déficits na retenção da memória recente (MR) (latência em segundos (s), aCSF: $183,2 \pm 25,46$; STZ: $79,77 \pm 30,53$, $P < 0,05$) e na memória tardia (MT) (latência (s), aCSF: $286,8 \pm 13,18$; STZ: $112,6 \pm 38,83$, $P < 0,0001$) quando comparados aos animais do grupo aCSF.

Este déficit foi protegido pelo tratamento com o ácido clorogênico na memória tardia (MT) (latência (s), STZ + ACG: $241,4 \pm 29,21$, $P < 0,01$) (FIGURA 24). O tratamento com a cafeína também foi capaz de proteger contra o déficit na memória recente (MR) (latência (s), STZ + CAF: $290,4 \pm 5,723$, $P < 0,0001$) e na memória tardia (MT) (latência, STZ + CAF: $300,0 \pm 0,00$, $P < 0,0001$) (FIGURA 24).

Figura 24 - Efeito do Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) sobre a memória aversiva recente e tardia em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.



Os animais foram tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) durante 26 dias, sendo medido o tempo de latência para o animal descer da plataforma durante sessões de 300 s, realizadas 15 min (memória recente) e 24 hs (memória tardia) após o treino, 24 e 25 dias, respectivamente, após a ICV-STZ (n = 10 animais/grupo). Os valores estão representados como média \pm EPM. * $P < 0,05$; *** $P < 0,0001$. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. MR (Memoria Recente); MT (Memoria Tardia); aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo – água destilada v.o.); STZ (Estreptozotocina); ACG (ácido clorogênico); CAF (Cafeína).

7. 5 Efeitos do Ácido Clorogênico e Cafeína sobre o déficit na memória espacial (Teste do Labirinto Aquático) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.

Na avaliação do aprendizado espacial através do labirinto aquático, os animais submetidos ICV-STZ apresentaram déficits na memória espacial (tempo de latência em segundos, aCSF: $12,77 \pm 1,162$; STZ: $32,07 \pm 7,54$, $P < 0,05$) (FIGURA 25A), demonstrando um maior tempo de latência para encontrar a plataforma quando comparados aos animais do grupo aCSF. O tratamento com o Ácido clorogênico e a cafeína foi capaz de promover uma melhora significativa no tempo de latência para encontrar o local da plataforma (tempo de latência em segundos, STZ + ACG: $14,53 \pm 2,31$; STZ + CAF: $15,72 \pm 1,55$, $P < 0,05$) (FIGURA 25A).

Com relação ao tempo de permanência no quadrante, os animais submetidos às injeções ICV-STZ apresentaram uma diminuição no tempo de permanência (tempo de permanência em segundos, aCSF: $13,35 \pm 1,369$; STZ: $7,78 \pm 1,031$, $P < 0,05$) (FIGURA 25B). O tratamento com o Ácido clorogênico e a cafeína foi capaz de promover um aumento significativo no tempo de permanência no quadrante (STZ + ACG: $15,56 \pm 0,97$; STZ +CAF: $16,46 \pm 0,68$, $P < 0,05$) (FIGURA 25B).

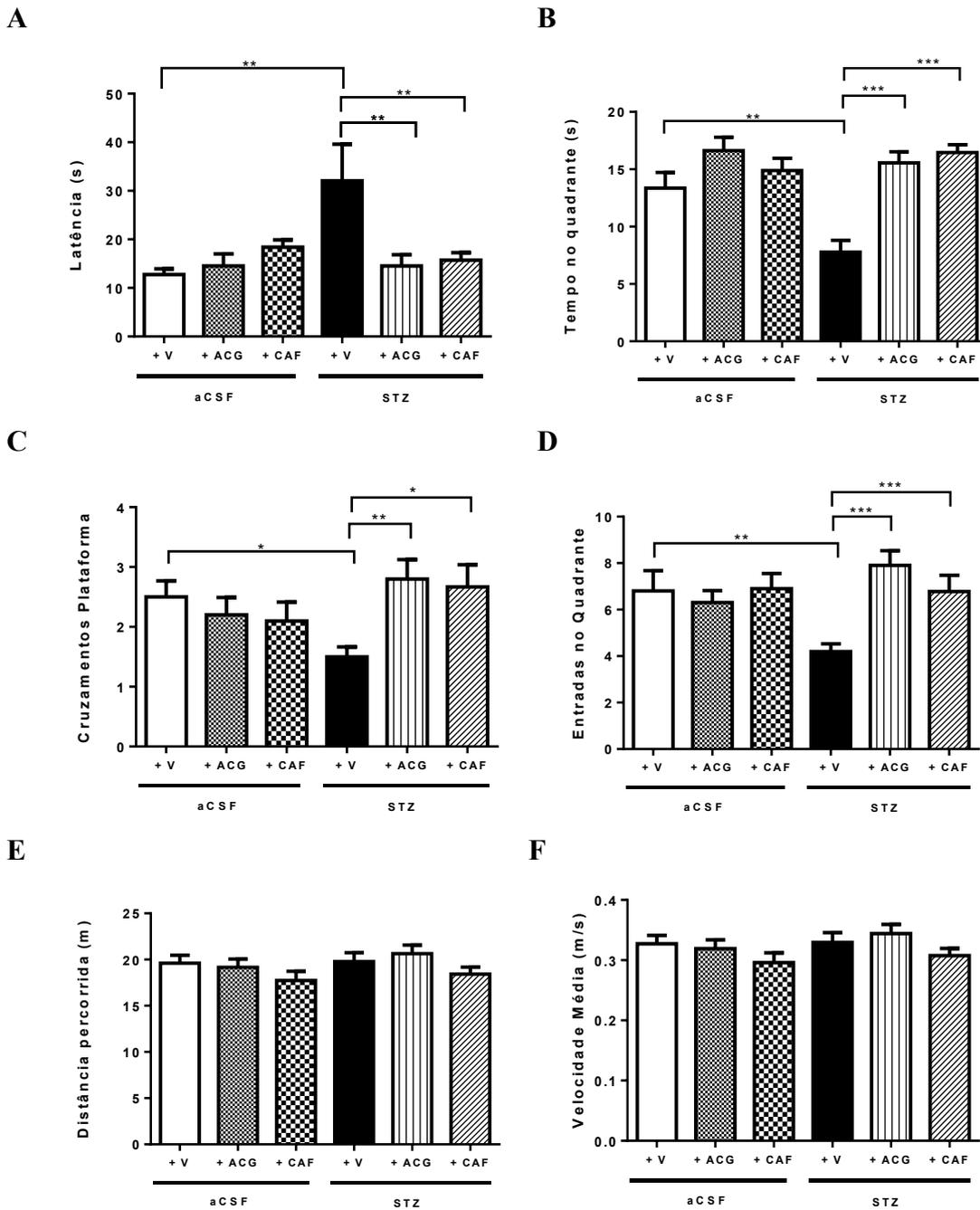
Quanto ao número de cruzamentos no local da plataforma, os animais submetidos às injeções ICV-STZ apresentaram uma diminuição no número de cruzamentos, (número de cruzamentos, aCSF: $2,50 \pm 0,26$; STZ: $1,5 \pm 0,16$, $P < 0,05$) (FIGURA 25C). O tratamento com o Ácido clorogênico e a cafeína foi capaz de promover um aumento significativo no número de cruzamentos no local da plataforma (STZ + ACG: $2,80 \pm 0,32$; STZ +CAF: $2,66 \pm 0,37$, $P < 0,05$) (FIGURA 25C).

Quanto ao número de entradas no quadrante onde se localiza a plataforma, os animais submetidos às injeções ICV-STZ apresentaram uma diminuição no número de cruzamentos, (número de cruzamentos, aCSF: $6,80 \pm 0,87$; STZ: $4,2 \pm 0,32$, $P < 0,05$) (FIGURA 25D). O tratamento com o Ácido clorogênico e a cafeína foi capaz de promover um aumento significativo no número de entradas no quadrante onde se localiza a plataforma (STZ + ACG: $7,90 \pm 0,64$; STZ +CAF: $6,77 \pm 0,70$, $P < 0,05$) (FIGURA 25D).

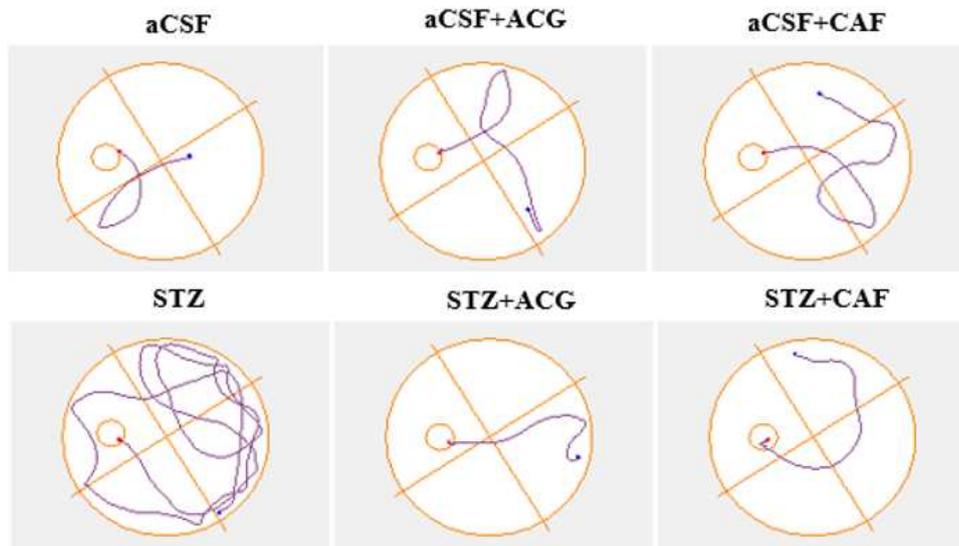
Com relação à distância percorrida pelos animais até chegarem à plataforma, não houve diferenças estatísticas entre os grupos (distância percorrida em metros, aCSF: $19,62 \pm 0,84$; aCSF + ACG: $19,16 \pm 0,88$; aCSF + CAF: $17,75 \pm 0,99$; STZ: $19,78 \pm 0,96$; STZ + ACG: $20,64 \pm 0,92$; STZ + CAF: $18,43 \pm 0,73$, $P < 0,05$) (FIGURA 25E).

Com relação à velocidade média dos animais, não houve diferenças estatísticas entre os grupos (velocidade média em m/s, aCSF: $0,32 \pm 0,01$; aCSF + ACG: $0,31 \pm 0,01$; aCSF + CAF: $0,29 \pm 0,01$; STZ: $0,32 \pm 0,01$; STZ + ACG: $0,34 \pm 0,01$; STZ + CAF: $0,30 \pm 0,01$, $P < 0,05$) (FIGURA 25F).

Figura 25 - Efeito do Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) sobre a memória espacial em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.



G

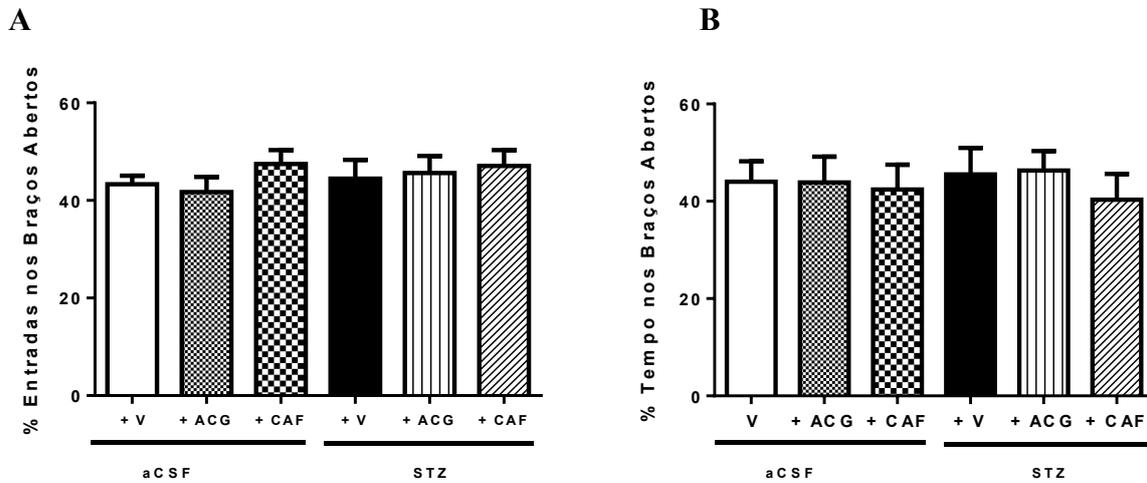


Os animais ($n = 10$ animais/grupo) foram tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) durante 26 dias, sendo a latência (A), tempo no quadrante (B), o número de cruzamentos na plataforma (C), entradas no quadrante (D), velocidade média (E), entradas no quadrante (F), avaliados pelo software *ANYmaze* (Stoelting Co., USA) durante 1 minuto, no 28º dia após a ICV-STZ. Os valores estão representados como média \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0001$. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. A) Latência (s). B) Tempo no quadrante (s). C) Cruzamentos na plataforma: D) Entradas no quadrante (s). E) Distância percorrida. F) Velocidade média. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. G) Imagem representativa da trajetória de um animal até o local da plataforma. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); ACG (Ácido Clorogênico); CAF (Cafeína).

7. 6 Efeitos do Ácido Clorogênico e Cafeína sobre a ansiedade em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.

Na avaliação da ansiedade através do teste do labirinto em cruz elevado não houve alterações significativa na porcentagem de entradas nos braços abertos e na porcentagem de tempo nos braços abertos entre os grupos, demonstrando que o modelo de ICV-STZ, nesse tempo de protocolo, e o tratamento com AGC e cafeína não causam alterações relacionadas à ansiedade (FIGURA 26A e 26B).

Figura 26 - Efeito do Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) sobre ansiedade em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.

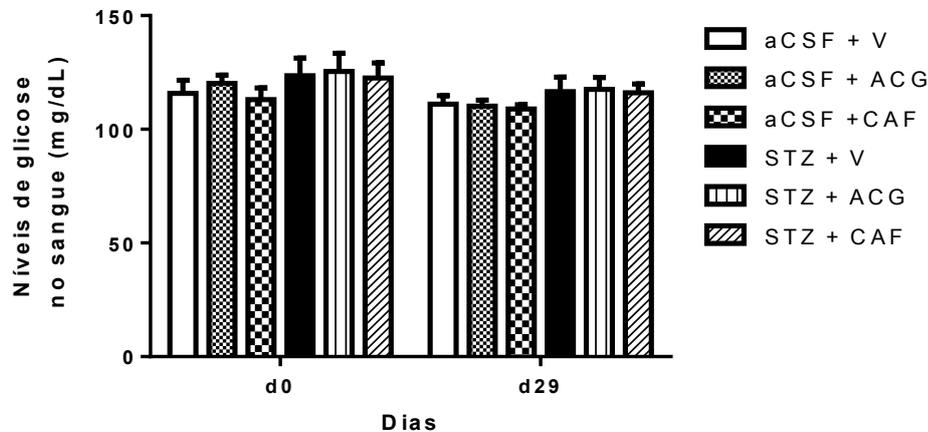


Os animais ($n = 10$ animais/grupo) foram tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) durante 26 dias, sendo medido o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos e fechados durante 5 minutos, avaliado pelo software *ANYmaze* (Stoelting Co., USA), 25 dias após a ICV-STZ ($n = 10$ animais/grupo). Os valores estão representados como média \pm EPM. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); ACG (Ácido Clorogênico); CAF (Cafeína).

7. 7 Níveis de glicose no sangue periférico em camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.

Os resultados obtidos dos níveis de glicose no sangue periférico demonstraram que não houve nenhuma alteração antes e após os procedimentos de indução com STZ e com o tratamento com o Ácido Clorogênico e Cafeína, demonstrando que os animais não estavam diabéticos. A Figura 27 mostra que os níveis de glicose não foram alterados em nenhum dos grupos experimentais avaliados neste estudo.

Figura 27 - Efeito do tratamento com o Ácido Clorogênico e Cafeína sobre a glicemia em camundongos submetidos ao modelo de DAE por STZ



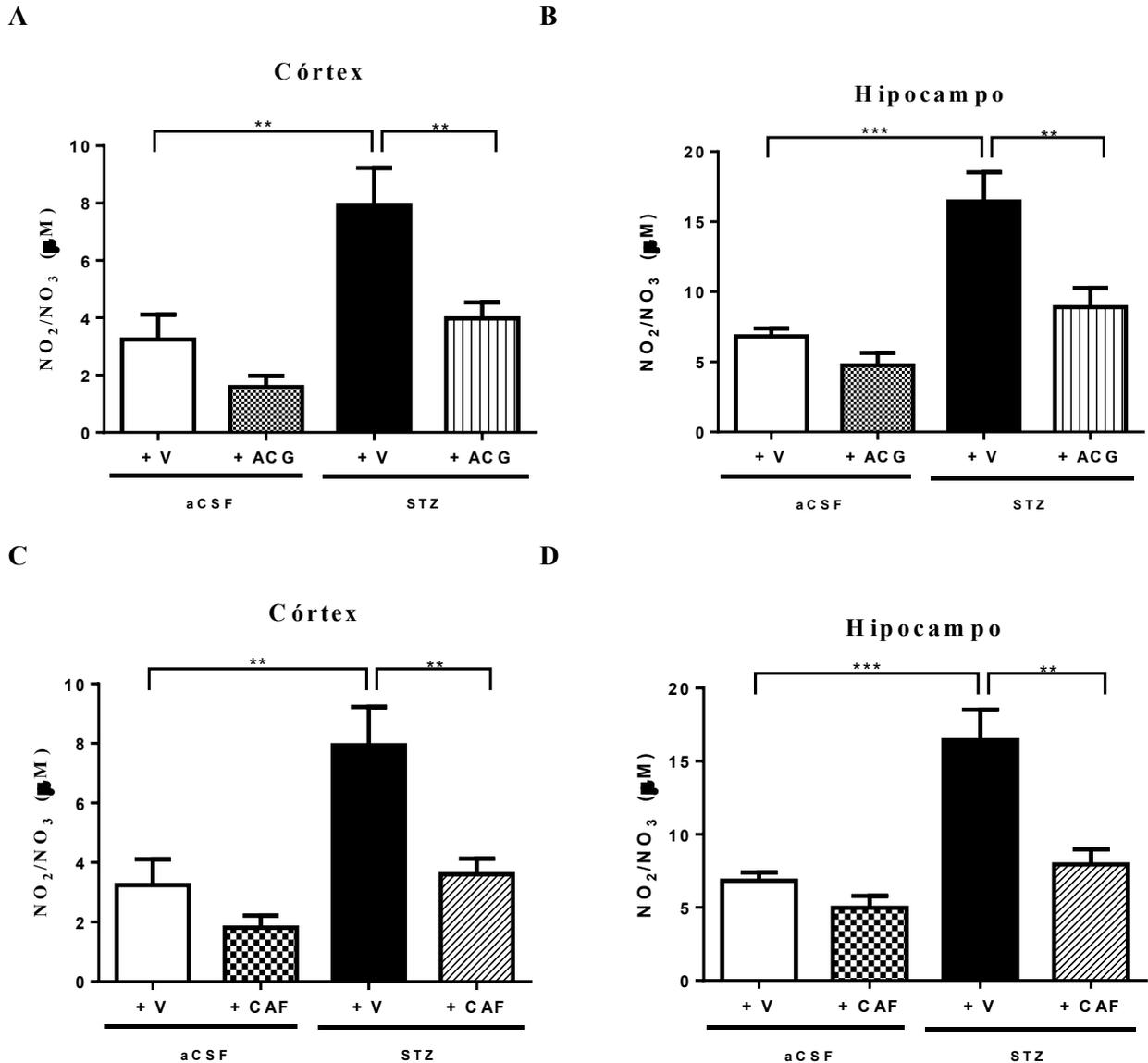
Os animais foram tratados com Ácido clorogênico e Cafeína v.o. durante 26 dias. A análise dos níveis de glicose no sangue dos camundongos ($n = 10$ animais/grupo) foi feita nos dias 0^o e 29^o, antes dos procedimentos de indução e imediatamente antes da eutanásia dos animais utilizando fitas de glicemia. Os valores estão representados como média \pm EPM. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); ACG (Ácido Clorogênico); CAF (Cafeína).

7. 8 Efeitos do Ácido Clorogênico e Cafeína sobre a dosagem de nitrito/nitrato (NO_2/NO_3) em tecidos cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.

Na dosagem de nitrito/nitrato no córtex e hipocampo, os animais submetidos a ICV-STZ apresentaram um aumento significativo nas concentrações de NO_2/NO_3 , no córtex (aCSF: $3,24 \pm 0,86$; STZ: $7,94 \pm 1,28$, $P < 0,05$) (FIGURA 28A e 28C) e no hipocampo (aCSF: $6,82 \pm 0,56$; STZ: $16,45 \pm 2,08$, $P < 0,05$) (FIGURA 28B e 28D).

O tratamento com o Ácido Clorogênico e Cafeína protegeu contra esse aumento da concentração de NO_2/NO_3 em ambas as áreas cerebrais (córtex, STZ +ACG: $3,97 \pm 0,56$; STZ + CAF: $3,67 \pm 0,52$, $P < 0,05$) (FIGURA 28A e 28C), (hipocampo, STZ +ACG: $8,90 \pm 1,37$; STZ + CAF: $7,94 \pm 1,04$, $P < 0,05$) (FIGURA 28B e 28D).

Figura 28 - Efeitos do Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) sobre a concentração de nitrito/nitrato (NO_2/NO_3) no córtex e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.



Os animais foram tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) durante 26 dias, sendo as áreas dissecadas para dosagem de nitrito/nitrato em μM 26 dias após a ICV-STZ ($n = 6$ animais/grupo). Os valores estão representados como média \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0001$. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); ACG (Ácido Clorogênico); CAF (Cafeína).

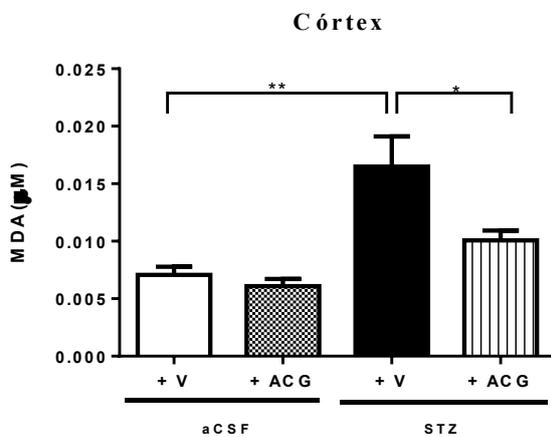
7. 9 Efeitos do Ácido Clorogênico e Cafeína sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em tecidos cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.

Os animais submetidos a ICV-STZ apresentaram um aumento significativo nas concentrações de MDA, no córtex (aCSF: $0,007 \pm 0,0007$; STZ: $0,01 \pm 0,002$, $P < 0,05$) (FIGURA 29A e 29C) e no hipocampo (aCSF: $0,006 \pm 0,001$; STZ: $0,014 \pm 0,0014$, $P < 0,05$) (FIGURA 29B e 29D).

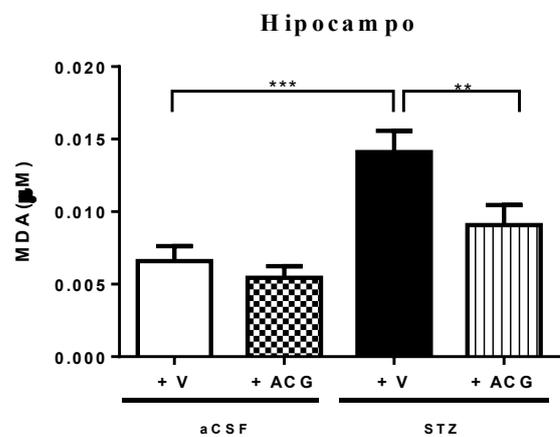
O tratamento com o Ácido Clorogênico e Cafeína foi capaz de diminuir significativamente esse aumento da concentração de MDA em ambas as áreas cerebrais, tanto no córtex (STZ +ACG: $0,01 \pm 0,0008$; STZ + CAF: $0,008 \pm 0,001$, $P < 0,05$) (FIGURA 29A e 29C), quanto no hipocampo (STZ +ACG: $0,009 \pm 0,001$; STZ + CAF: $0,008 \pm 0,001$, $P < 0,05$) (FIGURA 29B e 29D).

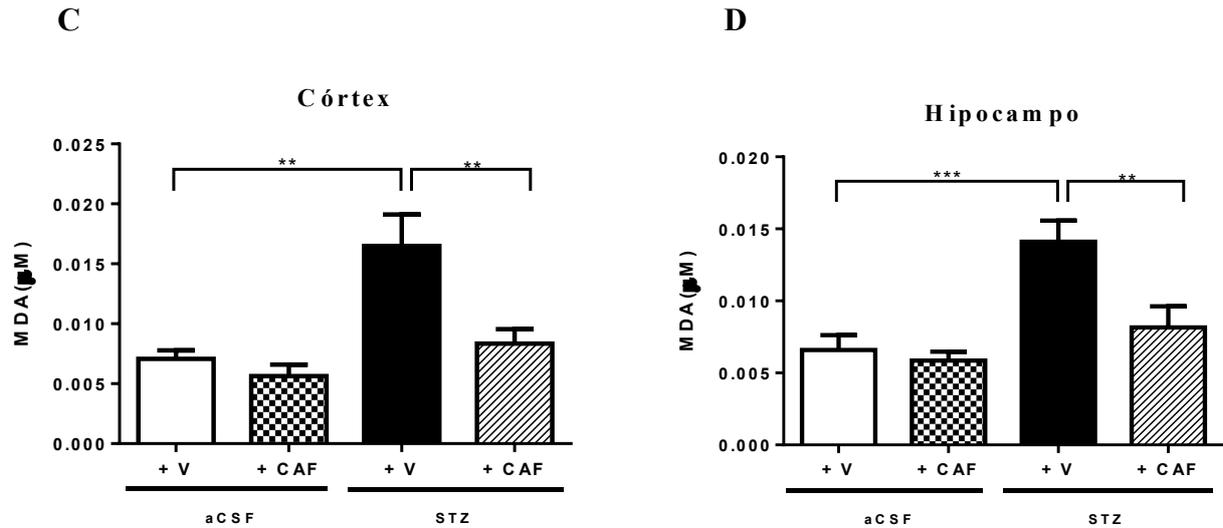
Figura 29 - Efeito do Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) sobre a peroxidação lipídica (TBARS) no córtex e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.

A



B



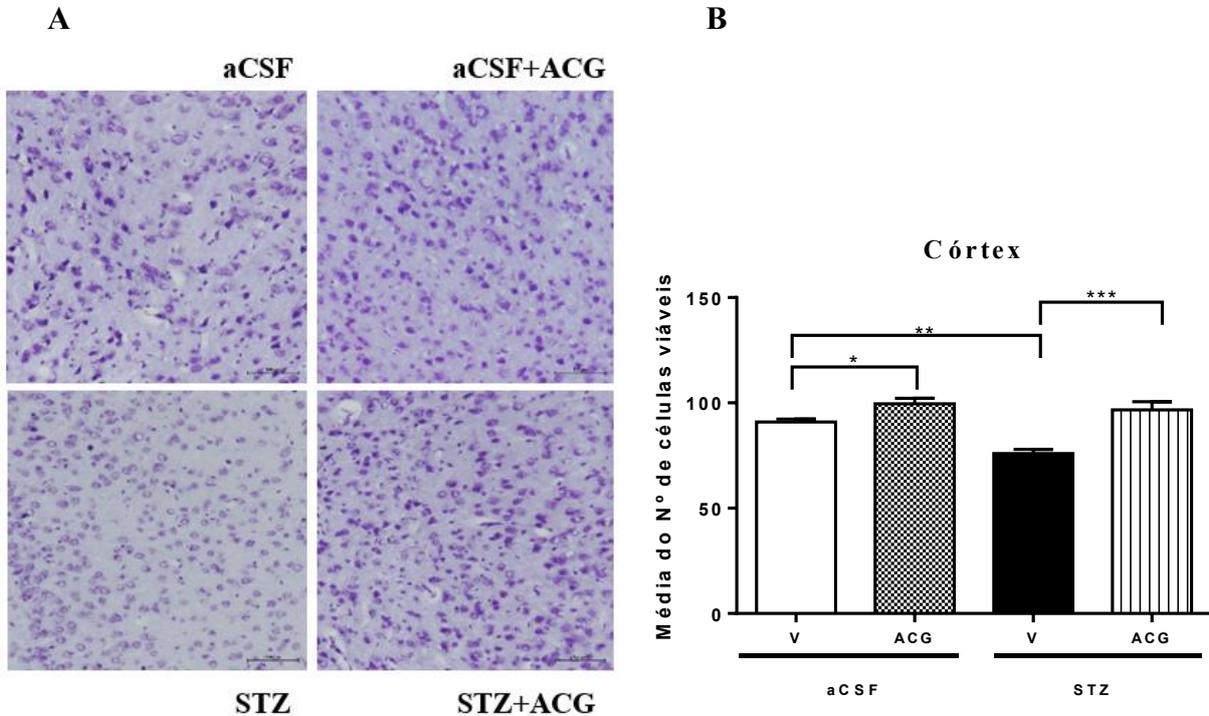


Os animais foram tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) e Cafeína (15 mg/kg v.o.) durante 26 dias, sendo as áreas dissecadas para dosagem de nitrito/nitrato em μM 26 dias após a ICV-STZ ($n = 6$ animais/grupo). Os valores estão representados como média \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0001$. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); ACG (Ácido Clorogênico); CAF (Cafeína).

7. 10 Efeito do Ácido Clorogênico 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 ICV-STZ.

Na avaliação da integridade neuronal através da coloração com o Cresil violeta, foi evidenciada uma diminuição da viabilidade celular no córtex pré-frontal dos animais submetidos a ICV-STZ (FIGURA 30) (média do número de células viáveis, aCSF: $90,89 \pm 1,459$; STZ: $75,98 \pm 1,927$) (FIGURA 30). O tratamento com o Ácido clorogênico foi capaz de proteger contra a diminuição do número de células viáveis, Nissl positivas, no córtex pré-frontal nos animais controles que não receberam STZ e nos animais que receberam STZ (média do número de células viáveis, aCSF+ACG: $99,51 \pm 2,665$, $P < 0,0001$; STZ+ACG: $96,71 \pm 3,815$, $P < 0,01$) (FIGURA 30).

Figura 30 - Avaliação da viabilidade celular através da coloração com o Cresil violeta no córtex pré-frontal de camundongos tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) após as injeções ICV-STZ



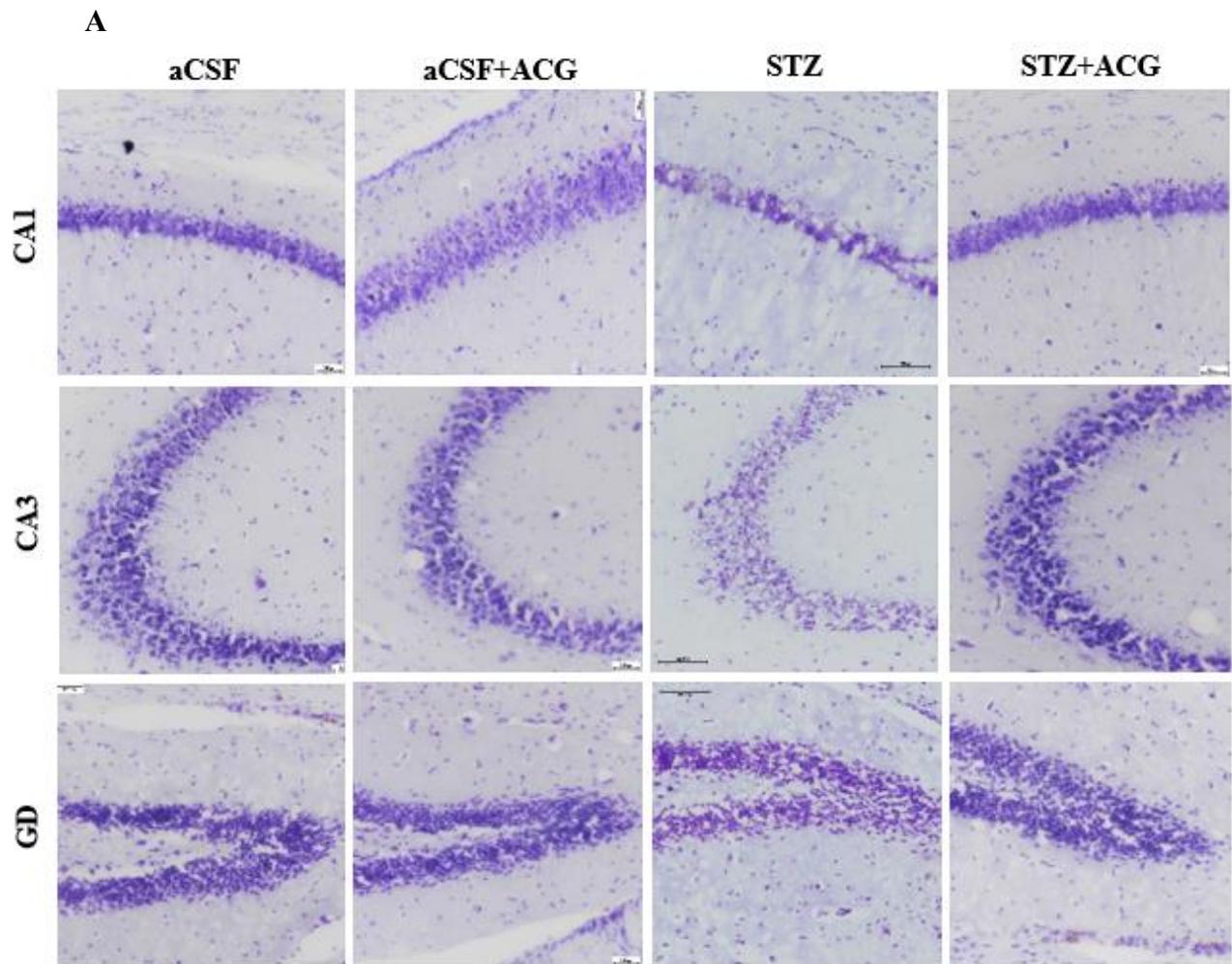
Os animais foram tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) durante 26 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise histológica com Cresil Violeta 26 dias após a ICV-STZ (n = 5-6 animais/grupo, 3 fatias/animal). A) Fotomicrografias (Violeta de Cresil), aumento 200x, representativas do grupo Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) sobre a viabilidade celular no córtex pré-frontal. B) Os valores estão representados como média \pm EPM. *P < 0,05; **P < 0,005; ***P < 0,0001. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); ACG (Ácido Clorogênico). Visualização: microscópio Nikon Elipse E200, com aumento de 200x, escala de 100 μ m.

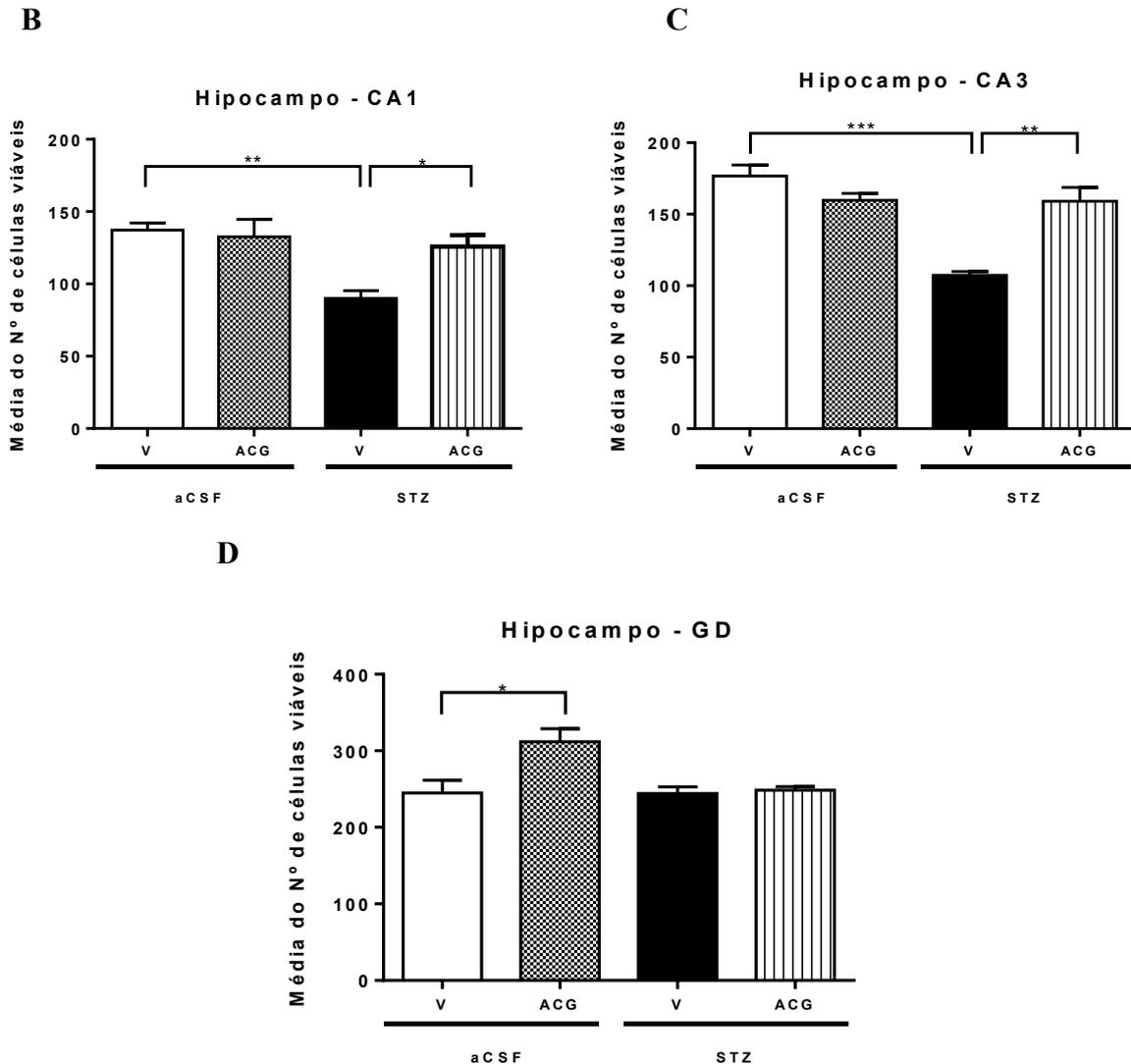
Foi observado um menor número de células viáveis nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo de animais submetidos às injeções ICV-STZ (FIGURA 31) (número de células viáveis, CA1- aCSF: $137,3 \pm 4,873$; STZ: $90,06 \pm 5,173$, P < 0,05; CA3 - aCSF: $176,8 \pm 7,631$; STZ: $107,3 \pm 2,669$, P < 0,05) (FIGURA 31B e 31C), não havendo uma diminuição significativa das células viáveis na região do GD (número de células viáveis, aCSF: $244,8 \pm 16,82$; STZ: $244,1 \pm 8,659$, P < 0,05) (FIGURA 31D).

O tratamento com o Ácido clorogênico foi capaz de aumentar significativamente a viabilidade celular nas regiões do CA1 e CA3 do hipocampo de animais submetidos às injeções ICV-STZ (número de células viáveis, CA1 - STZ+ACG: $125,8 \pm 7,920$, P < 0,05); CA3 - STZ+ACG: $159,1 \pm 9,714$, P < 0,05) (FIGURA 31B e 31C).

Na região do GD, o tratamento com o Ácido clorogênico foi capaz de aumentar significativamente a viabilidade celular nos animais controles que não receberam STZ (número de células viáveis, aCSF+ACG: $311,9 \pm 16,81$, $P < 0,05$) (FIGURA 31D), havendo um aumento significativo do número de neurônios viáveis nessa região.

Figura 31 - Avaliação da viabilidade celular através da coloração com o Cresil violeta no hipocampo nas regiões CA1, CA3 e GD de camundongos tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) após a ICV-STZ.





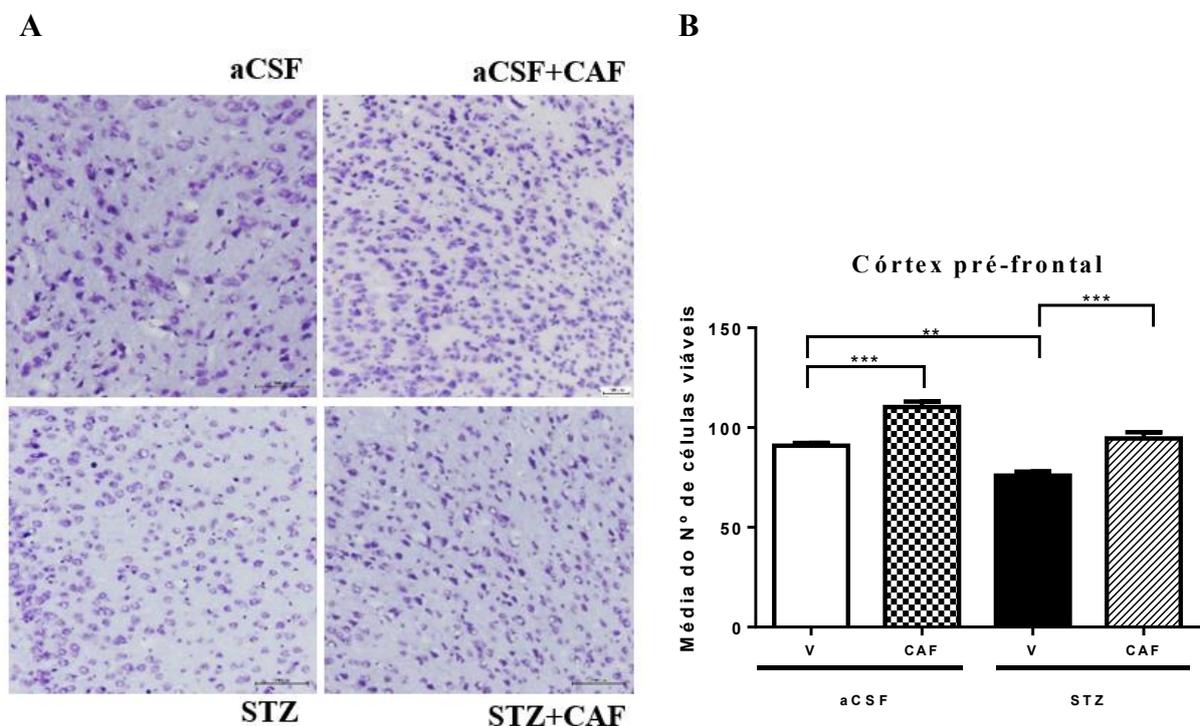
Os animais foram tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) durante 26 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise histológica com Cresil Violeta 26 dias após a ICV-STZ (n = 5-6 animais/grupo, 3 fatias/animal). A) Fotomicrografias (Violeta de Cresil), aumento 200x, representativas do grupo Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) sobre a viabilidade celular no Hipocampo, regiões CA1, CA3 e GD. Os valores estão representados como média \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0001$. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); ACG (Ácido Clorogênico). Visualização: microscópio Nikon Elipse E200, com aumento de 200x, escala de 100 μ m.

7. 11 Efeito da Cafeína 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 ICV-STZ.

Na avaliação da integridade neuronal através da coloração com o Cresil violeta, foi evidenciada uma diminuição da viabilidade celular no córtex pré-frontal de animais submetidos às injeções ICV-STZ (FIGURA 32) (número de células viáveis, aCSF: $90,89 \pm$

1,459; STZ: $75,98 \pm 1,927$) (FIGURA 32). O tratamento com a Cafeína foi capaz de proteger contra a diminuição do número de células viáveis no córtex pré-frontal nos animais controles que não receberam STZ e nos animais que receberam STZ, em comparação com o grupo de animais submetidos apenas as injeções ICV-STZ (média do número de células viáveis: aCSF+CAF: $110,3 \pm 2,720$, $P < 0,0001$; STZ+CAF: $94,56 \pm 3,147$, $P < 0,001$) (FIGURA 32).

Figura 32 - Avaliação da viabilidade celular através da coloração com o Cresil violeta no córtex pré-frontal de camundongos tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) após as injeções ICV-STZ



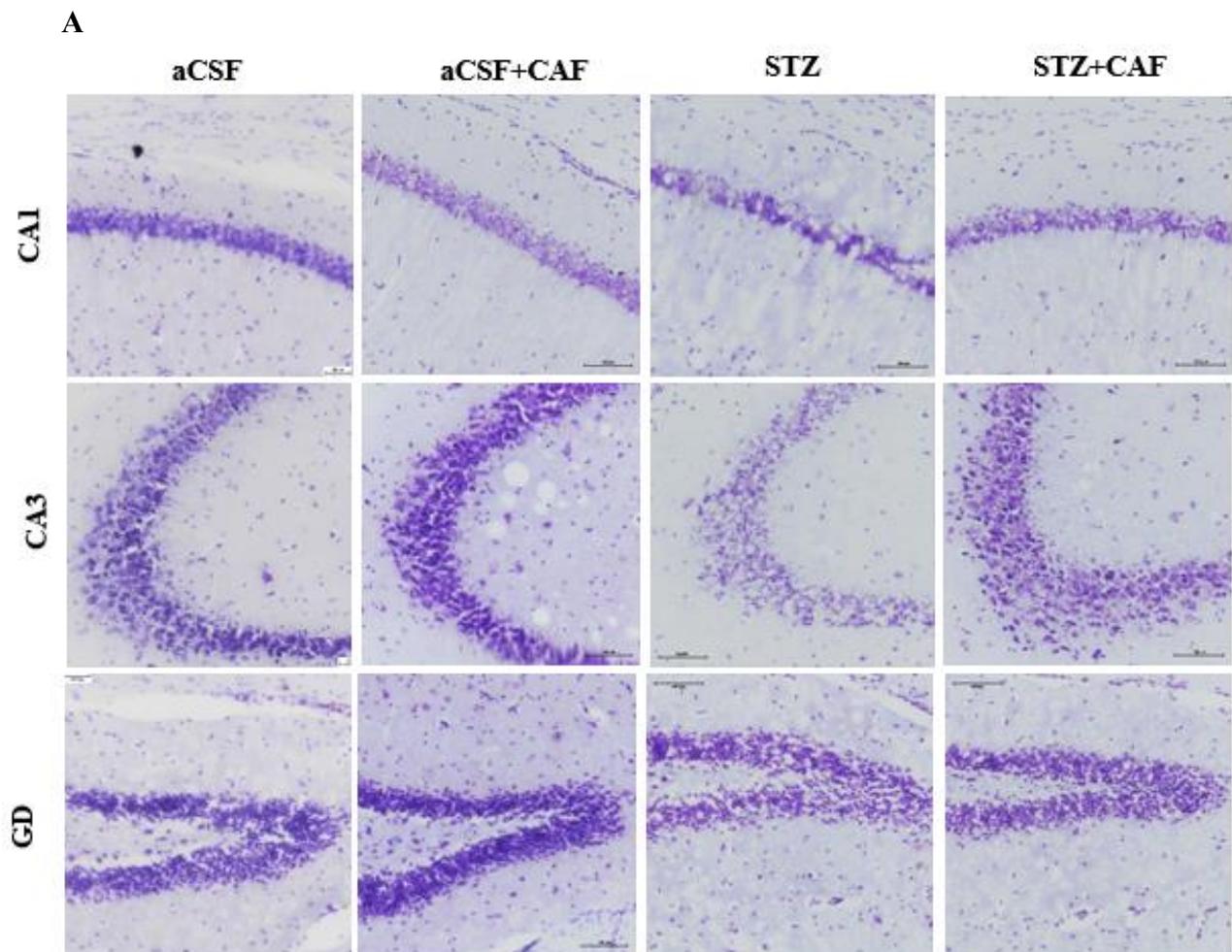
Os animais foram tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) durante 26 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise histológica com Cresil Violeta 26 dias após a ICV-STZ ($n = 5-6$ animais/grupo, 3 fatias/animal). A) Fotomicrografias (Violeta de Cresil), aumento 200x, representativas do efeito da Cafeína (15 mg/kg v.o.) sobre a viabilidade celular no córtex pré-frontal. B) Os valores estão representados como média \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0001$. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); CAF (Cafeína). Visualização: microscópio Nikon Eclipse E200, com aumento de 200x, escala de 100 μ m.

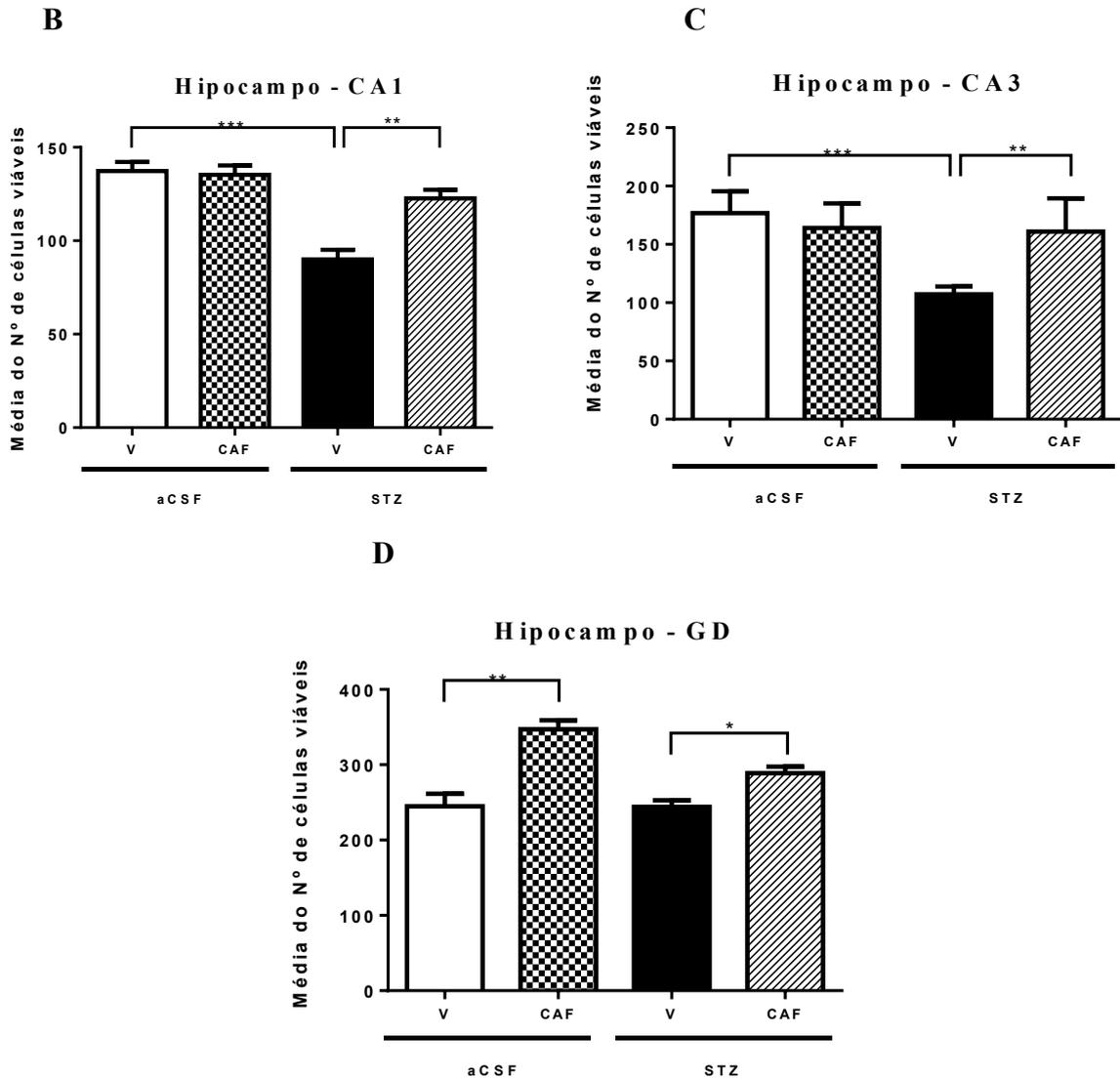
Foi observado um menor número de células viáveis nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo de animais submetidos às injeções ICV-STZ (FIGURA 33B) (número de células viáveis, CA1- aCSF: $137,3 \pm 4,873$; STZ: $90,06 \pm 5,173$, $P < 0,05$; CA3 - aCSF: $176,8 \pm 7,631$; STZ: $107,3 \pm 2,669$, $P < 0,05$) (FIGURA 33B e 33C), não havendo uma diminuição significativa das células viáveis na região do GD (número de células viáveis, aCSF: $244,8 \pm 16,82$; STZ: $244,1 \pm 8,659$, $P < 0,05$) (FIGURA 33D).

O tratamento com a Cafeína foi capaz de aumentar significativamente a viabilidade celular nas regiões do CA1 e CA3 do hipocampo de animais submetidos às injeções ICV-STZ (número de células viáveis, CA1 - STZ+CAF: $122,7 \pm 4,602$, $P < 0,001$; CA3 - STZ+CAF: $160,9 \pm 12,73$, $P < 0,001$) (FIGURA 33B e 33C), havendo um aumento significativo do número de neurônios viáveis nessas regiões.

Na região do GD, o tratamento com a Cafeína foi capaz de aumentar significativamente a viabilidade celular nos animais controles que não receberam STZ e nos animais que receberam STZ (número de células viáveis, aCSF+CAF: $347,3 \pm 11,97$, $P < 0,0001$; STZ+CAF: $288,7 \pm 8,894$, $P < 0,05$) (FIGURA 33D), havendo um aumento significativo do número de neurônios viáveis nessa região.

Figura 33 - Avaliação da viabilidade celular através da coloração com o Cresil violeta no hipocampo nas regiões CA1, CA3 e GD de camundongos tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) após as injeções ICV-STZ





Os animais foram tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) durante 26 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise histológica com Cresil Violeta 26 dias após a ICV-STZ (n = 5-6 animais/grupo, 3 fatias/animal. A) Fotomicrografias (Violeta de Cresil), aumento 200x, representativas do efeito do Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) sobre a viabilidade celular no Hipocampo, regiões CA1, CA3 e GD. Os valores estão representados como média \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0001$. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); CAF (Cafeína). Visualização: microscópio Nikon Elipse E200, com aumento de 200x, escala de 100 μ m.

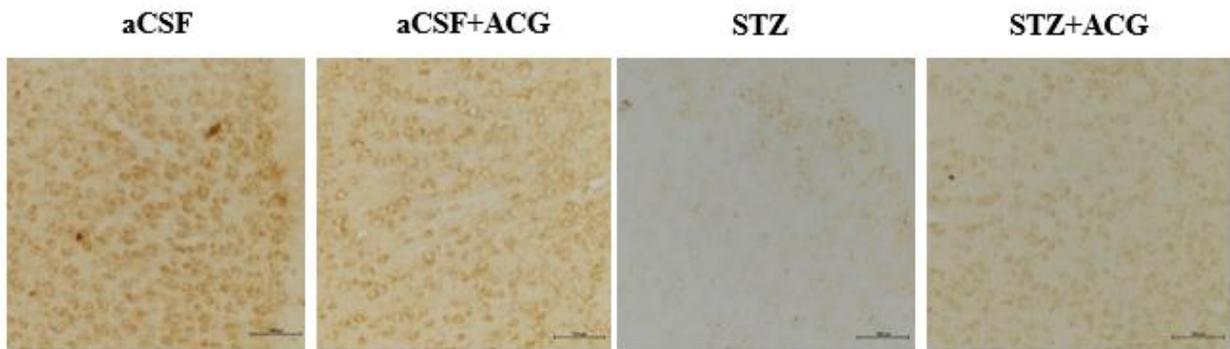
7. 12 Efeito do Ácido Clorogênico sobre a imunomarcção para BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.

Foi evidenciada uma diminuição na imunomarcção para BDNF no córtex pré-frontal de animais submetidos às injeções ICV-STZ (FIGURA 34) (Densidade óptica: % da média dos controles, aCSF: $100,0 \pm 10,32$; STZ: $16,91 \pm 1,96$, $P < 0,0001$) (FIGURA 34). O tratamento com o Ácido clorogênico foi capaz de aumentar significativamente a

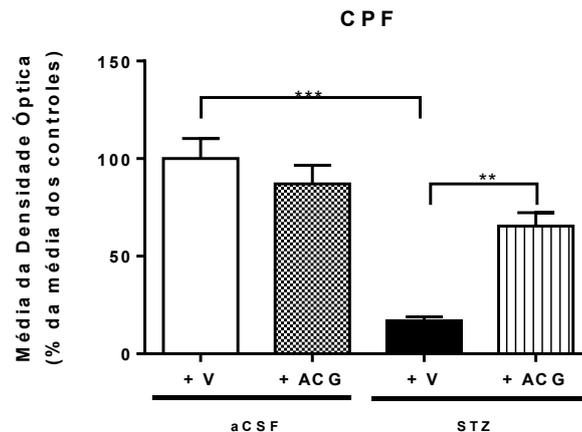
imunomarcção para BDNF no córtex pré-frontal em comparação com o grupo de animais submetidos as injeções ICV-STZ (Densidade óptica: % da média dos controles, STZ+ACG: $65,49 \pm 6,78$, $P < 0,001$) (FIGURA 34).

Figura 34 - Avaliação da imunomarcção para BDNF no córtex pré-frontal de camundongos tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) após as injeções ICV-STZ

A



B

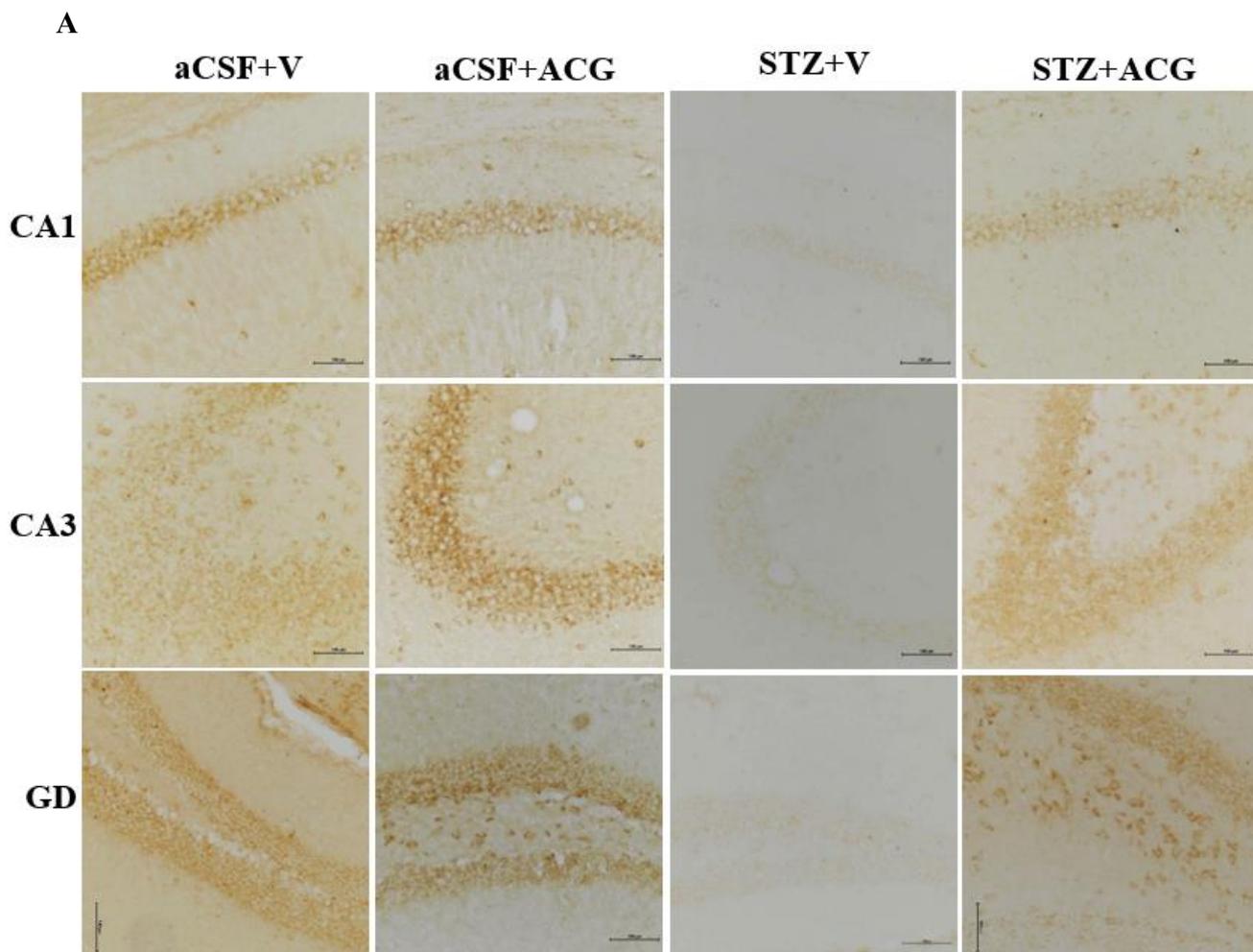


Os animais foram tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) durante 26 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise da imunohistoquímica com o BDNF 26 dias após a ICV-STZ (n = 5-6 animais/grupo, 3 fatias/animal). A) Fotomicrografias (BDNF), aumento 200x, representativas do grupo Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) sobre a imunomarcção para BDNF no córtex pré-frontal. B) Os valores estão representados como média \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0001$. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); ACG (Ácido Clorogênico). Visualização: microscópio Nikon Elipse E200, com aumento de 200x, escala de 100 μ m.

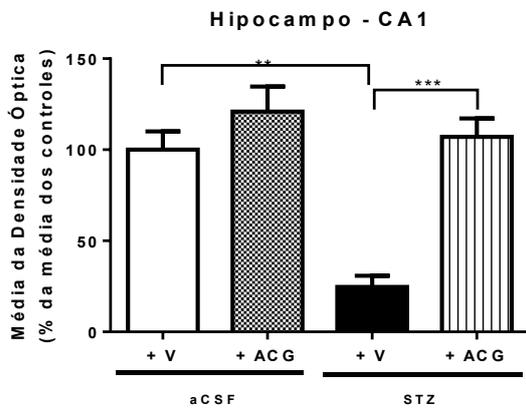
Foi observado uma diminuição da imunomarcção para BDNF nas regiões CA1, CA3 e DG do hipocampo de animais submetidos às injeções ICV-STZ (FIGURA 35) (Densidade óptica: % da média dos controles, CA1- aCSF: $100,0 \pm 10,12$; STZ: $24,63 \pm 6,17$, $P < 0,001$; CA3 - aCSF: $100,0 \pm 10,96$; STZ: $20,96 \pm 2,98$, $P < 0,001$; GD - aCSF: $100,0 \pm 15,13$; STZ: $25,69 \pm 3,45$, $P < 0,0001$) (FIGURA 35). O tratamento com o Ácido clorogênico foi capaz de

aumentar significativamente a imunomarcação para BDNF nas regiões do CA1, CA3 e DG do hipocampo de animais submetidos às injeções ICV-STZ (Densidade  ptica: % da média dos controles, CA1 - STZ+ACG: $107,0 \pm 10,12$, $P < 0,0001$; CA3 - STZ+ACG: $80,34 \pm 14,87$, $P < 0,005$; GD - STZ+ACG: $73,67 \pm 6,97$, $P < 0,005$) (FIGURA 35).

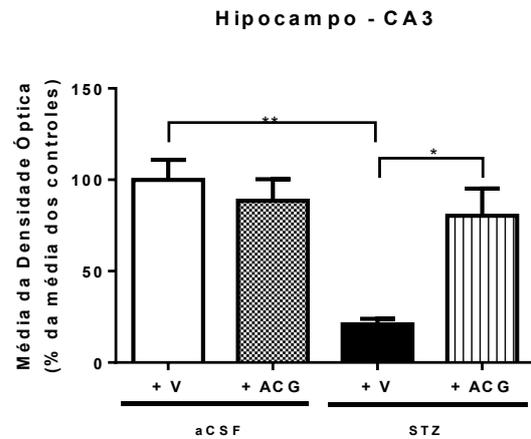
Figura 35 - Avaliação da imunomarcação para BDNF no hipocampo nas regiões CA1, CA3 e GD de camundongos tratados com  cido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) após ICV-STZ.



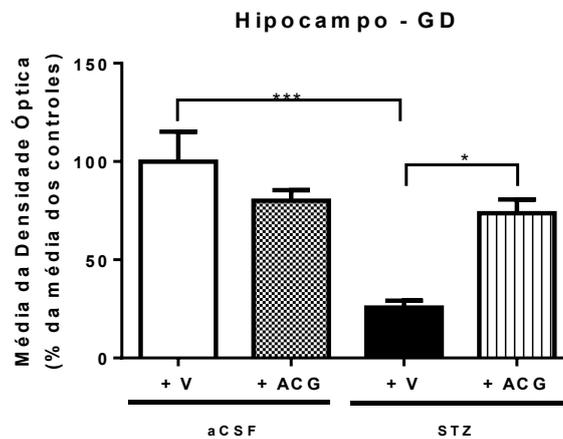
B



C



D



Os animais foram tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) durante 26 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise da imunohistoquímica com o BDNF 26 dias após a ICV-STZ (n = 5-6 animais/grupo, 3 fatias/animal). A) Fotomicrografias (BDNF), aumento 200x, representativas do grupo Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) sobre a imunomarcção para BDNF no Hipocampo, regiões CA1, CA3 e GD. Os valores estão representados como média \pm EPM. *P<0,05; **P<0,005; ***P<0,0001. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); ACG (Ácido Clorogênico). Visualização: microscópio Nikon Elipse E200, com aumento de 200x, escala de 100 μ m.

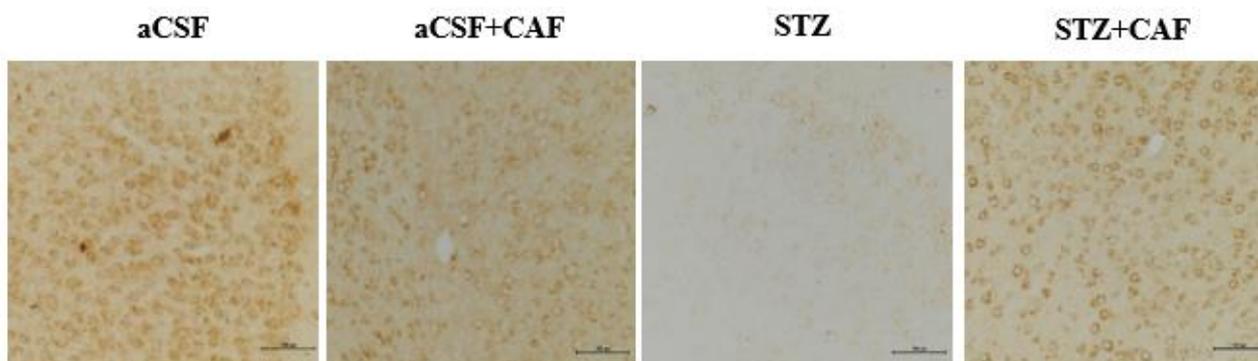
7. 13 Efeito da Cafeína sobre a imunomarcção para BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.

Foi evidenciada uma diminuição da imunomarcção para BDNF no córtex pré-frontal de animais submetidos às injeções ICV-STZ (FIGURA 36) (Densidade óptica: % da média dos controles, aCSF: 100,0 \pm 10,32; STZ: 16,91 \pm 1,96, P < 0,0001) (FIGURA 36). O tratamento com a Cafeína foi capaz de aumentar significativamente a imunomarcção para BDNF no córtex pré-frontal em comparação com o grupo de animais submetidos as injeções

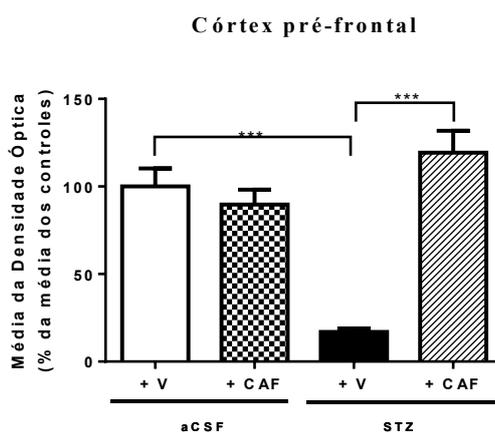
ICV-STZ (Densidade óptica: % da média dos controles, STZ+CAF: $119,3 \pm 12,46$, $P < 0,0001$) (FIGURA 36).

Figura 36 - Avaliação da imunomarcção para BDNF no córtex pré-frontal de camundongos tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) após as injeções ICV-STZ

A



B



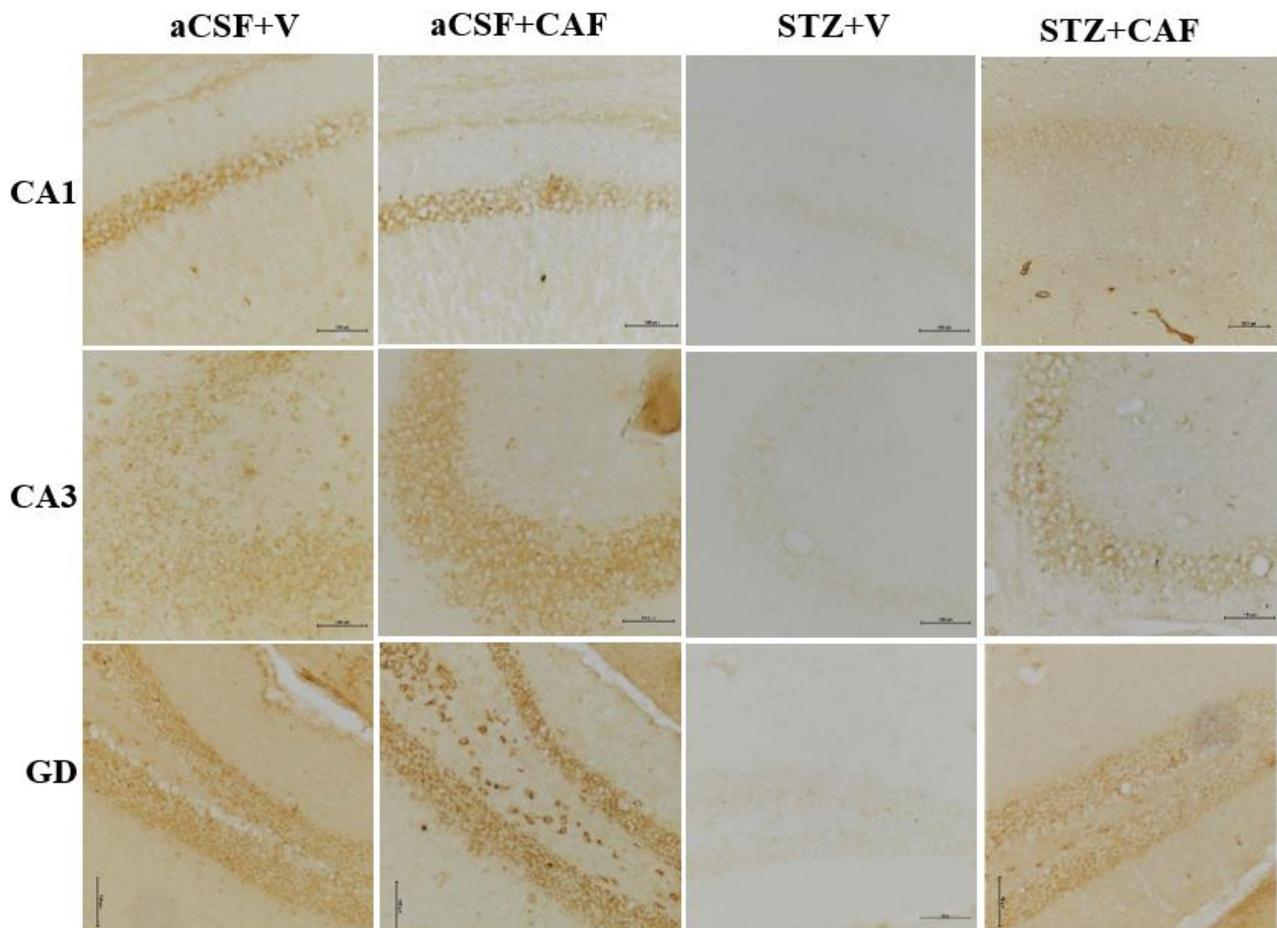
Os animais foram tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) durante 26 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise da imunohistoquímica com o BDNF 26 dias após a ICV-STZ ($n = 5-6$ animais/grupo, 3 fatias/animal. A) Fotomicrografias (BDNF), aumento 200x, representativas do grupo Cafeína (15 mg/kg v.o.) sobre a imunomarcção para BDNF no córtex pré-frontal. B) Os valores estão representados como média \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0001$. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); CAF (Cafeína). Visualização: microscópio Nikon Eclipse E200, com aumento de 200x, escala de 100 μ m.

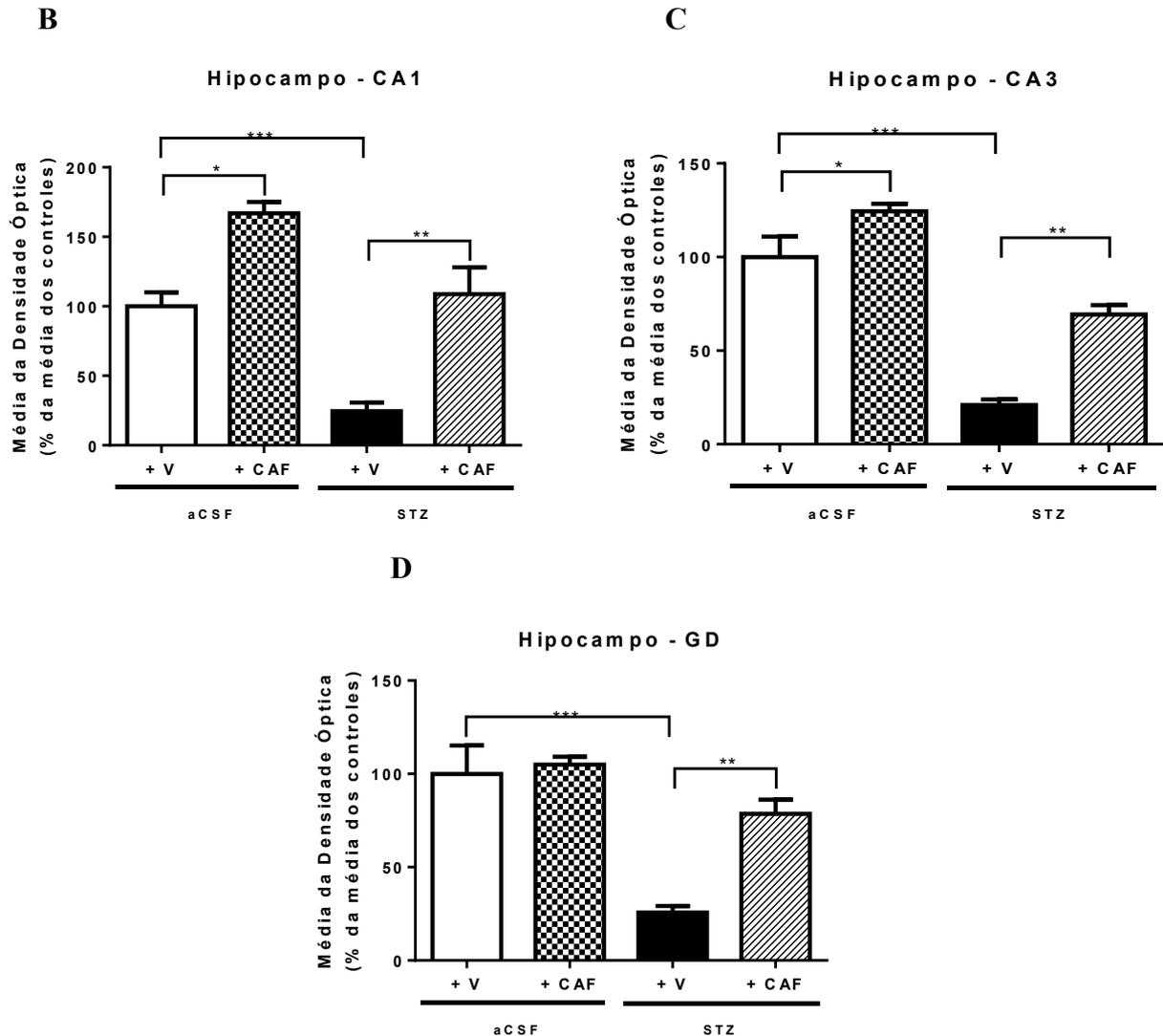
Foi observado uma diminuição da imunomarcção para BDNF nas regiões CA1, CA3 e DG do hipocampo de animais submetidos a ICV-STZ (FIGURA 37) (Densidade óptica: % da média dos controles, CA1- aCSF: $100,0 \pm 10,12$; STZ: $24,63 \pm 6,17$, $P < 0,001$; CA3 - aCSF: $100,0 \pm 10,96$; STZ: $20,96 \pm 2,98$, $P < 0,0001$; GD - aCSF: $100,0 \pm 15,13$; STZ: $25,69 \pm 3,45$, $P < 0,0001$) (FIGURA 37).

O tratamento com a Cafeína foi capaz de aumentar significativamente a imunomarcção para BDNF nas regiões do CA1, CA3 e DG do hipocampo de animais submetidos às injeções ICV-STZ (Densidade óptica: % da média dos controles, CA1 - STZ+CAF: $108,7 \pm 19,46$, $P < 0,001$; CA3 - STZ+CAF: $69,31 \pm 5,03$, $P < 0,001$; GD - STZ+CAF: $78,52 \pm 7,66$, $P < 0,005$) e nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo de animais controle que não receberam as injeções ICV-STZ (Densidade óptica: % da média dos controles, CA1 - aCSF+CAF: $166,9 \pm 8,08$, $P < 0,005$; CA3 - aCSF+CAF: $124,5 \pm 3,93$, $P < 0,05$) (FIGURA 37).

Figura 37 - Avaliação da imunomarcção para BDNF no hipocampo nas regiões CA1, CA3 e GD de camundongos tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) após a ICV-STZ

A





Os animais foram tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) durante 26 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise da imunohistoquímica com o BDNF 26 dias após a ICV-STZ (n = 5-6 animais/grupo, 3 fatias/animal. A) Fotomicrografias (BDNF), aumento 200x, representativas do grupo Cafeína (15 mg/kg v.o.) sobre a imunomarcção para BDNF no Hipocampo, regiões CA1, CA3 e GD. Os valores estão representados como média \pm EPM. *P<0,05; **P<0,005; ***P<0,0001. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); CAF (Cafeína). Visualização: microscópio Nikon Elipse E200, com aumento de 200x, escala de 100 μ m.

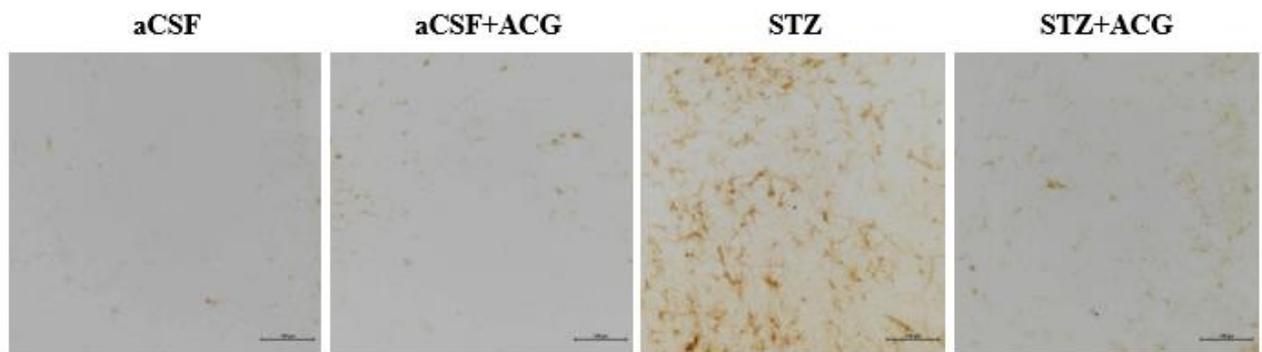
7. 14 Efeito do Ácido Clorogênico sobre a ativação de astrócitos através da imunomarcção com o GFAP no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.

Na avaliação da ativação de astrócitos (astrogliose) através da imunomarcção com o GFAP, foi evidenciada um aumento da ativação de astrócitos no córtex pré-frontal de animais submetidos às injeções ICV-STZ (FIGURA 38) (Densidade óptica: % da média dos controles, aCSF: 100,0 \pm 17,77; STZ: 526,8 \pm 88,27, P < 0,0001) (FIGURA 38). O tratamento com o

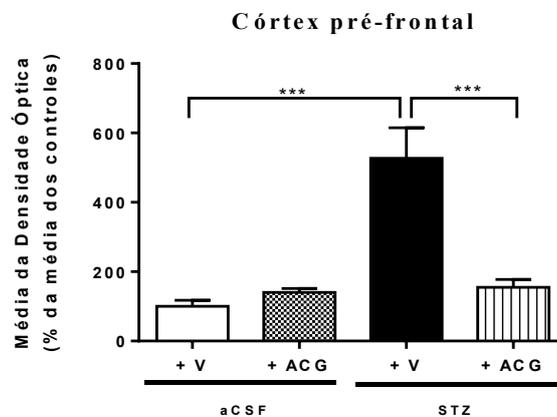
Ácido clorogênico foi capaz de diminuir significativamente a ativação de astrócitos no córtex pré-frontal em comparação com o grupo de animais submetidos às injeções ICV-STZ (Densidade óptica: % da média dos controles, STZ+ACG: $154,8 \pm 23,03$, $P < 0,0001$) (FIGURA 38).

Figura 38 - Avaliação da ativação de astrócitos (astroglíose) através da imunomarcagem com o GFAP no córtex pré-frontal de camundongos tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) após as injeções ICV-STZ

A



B



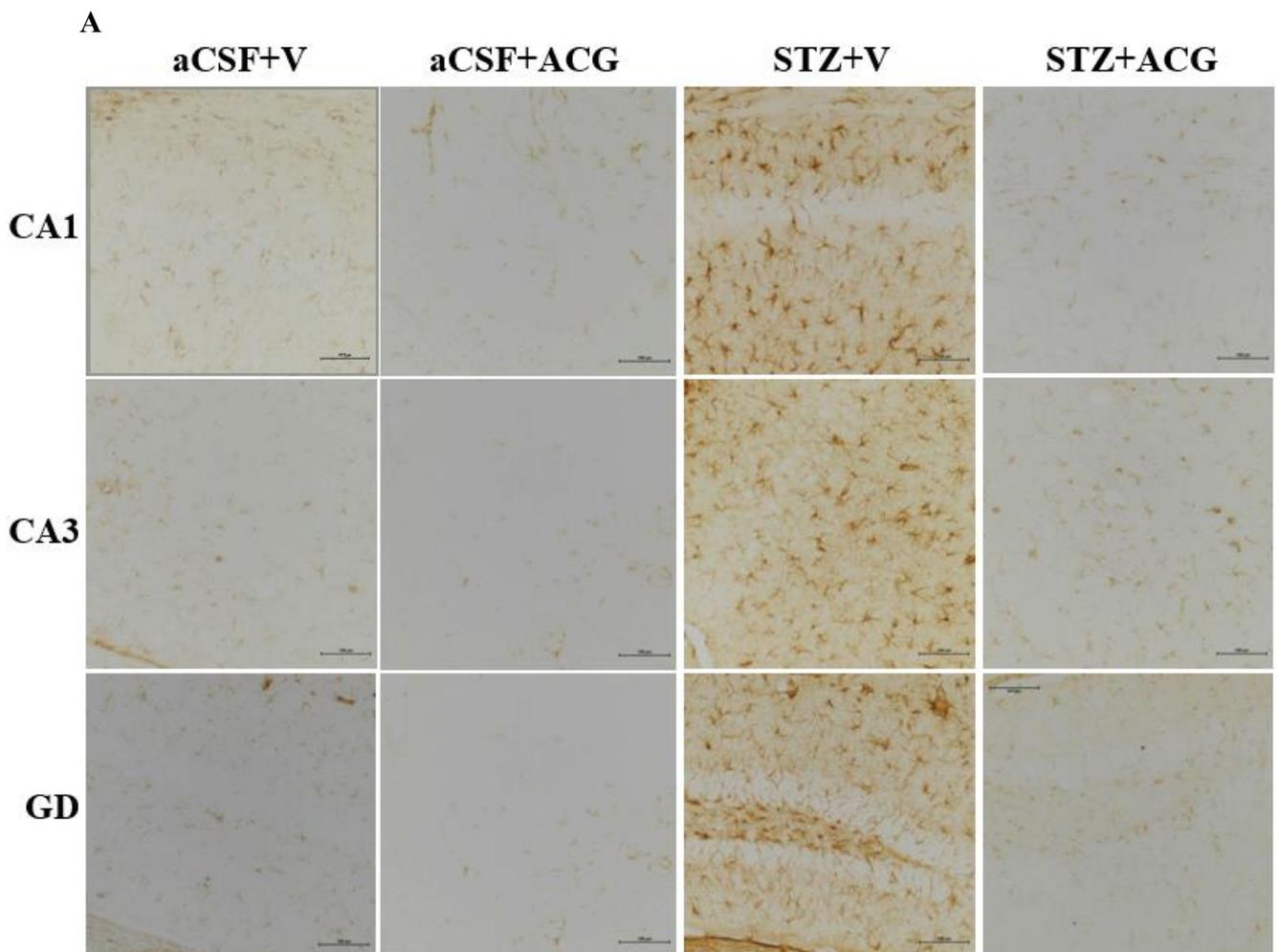
Os animais foram tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) durante 26 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise da imunohistoquímica com o GFAP 26 dias após a ICV-STZ ($n = 5-6$ animais/grupo, 3 fatias/animal). A) Fotomicrografias representativas do efeito do Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) sobre a ativação de astrócitos no córtex pré-frontal. B) Os valores estão representados como média \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0001$. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); ACG (Ácido Clorogênico). Visualização: microscópio Nikon Eclipse E200, com aumento de 200x, escala de 100 μ m.

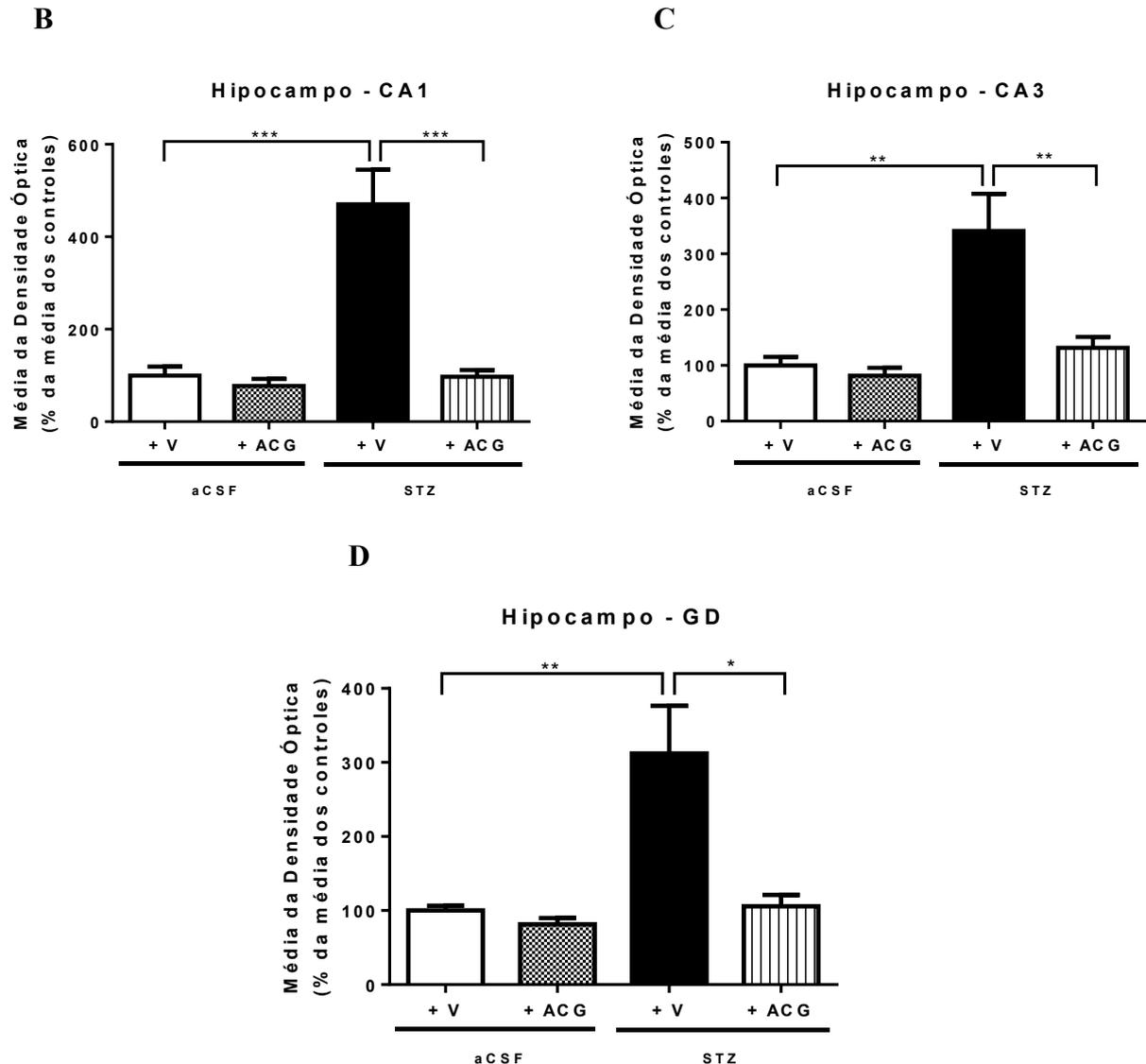
Foi observado um aumento significativo da ativação dos astrócitos nas regiões CA1, CA3 e DG do hipocampo de animais submetidos às injeções ICV-STZ (FIGURA 39) (Densidade óptica: % da média dos controles, CA1- aCSF: $100,0 \pm 19,12$; STZ: $470,3 \pm$

74,97, $P < 0,0001$; CA3 - aCSF: $100,0 \pm 15,21$; STZ: $341,1 \pm 66,66$, $P < 0,001$; GD - aCSF: $100,0 \pm 6,52$; STZ: $312,3 \pm 64,30$, $P < 0,001$) (FIGURA 39).

O tratamento com o Ácido clorogênico foi capaz de diminuir significativamente a ativação dos astrócitos nas regiões do CA1, CA3 e DG do hipocampo de animais submetidos às injeções ICV-STZ (Densidade óptica: % da média dos controles, CA1 - STZ+ACG: $97,17 \pm 14,75$ $P < 0,0001$; CA3 - STZ+ACG: $131,4 \pm 19,68$, $P < 0,005$; GD - STZ+ACG: $105,8 \pm 15,33$, $P < 0,005$) (FIGURA 39), havendo uma diminuição significativa da marcação para GFAP nessas regiões.

Figura 39 - Avaliação da ativação de astrócitos (astroglíose) através da imunomarcagem com o GFAP no hipocampo nas regiões CA1, CA3 e GD de camundongos tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) após a ICV-STZ.





Os animais foram tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) durante 26 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise da imunohistoquímica com o GFAP 26 dias após a ICV-STZ (n = 5-6 animais/grupo, 3 fatias/animal). A) Fotomicrografias representativas do efeito do Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) sobre a ativação de astrócitos no Hipocampo, regiões CA1, CA3 e GD. Os valores estão representados como média \pm EPM. *P<0,05; **P<0,005; ***P<0,0001. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); ACG (Ácido Clorogênico). Visualização: microscópio Nikon Elipse E200, com aumento de 200x, escala de 100 μ m.

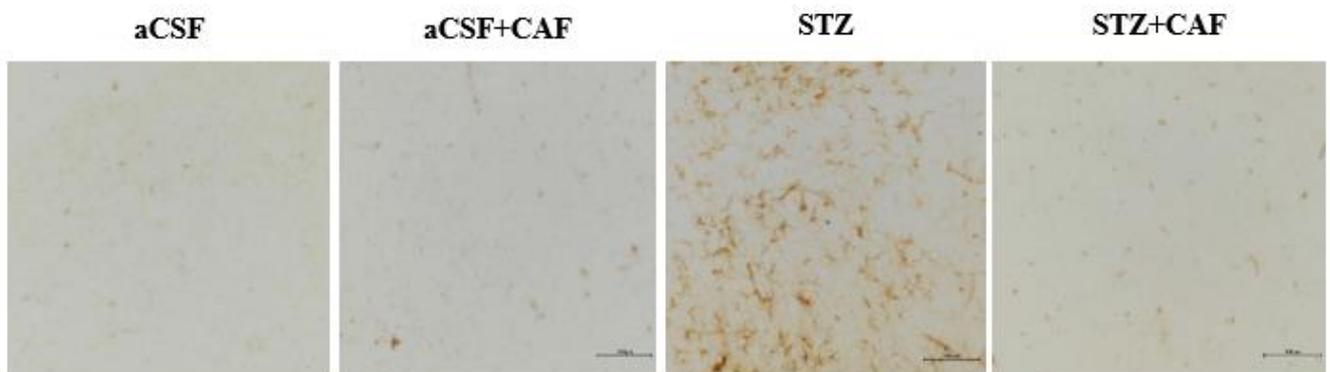
7. 15 Efeito da Cafeína sobre a ativação de astrócitos através da imunomarcção com o GFAP no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.

A ativação de astrócitos (astroglíose) através da imunomarcção com o GFAP foi evidenciada no córtex pré-frontal de animais submetidos às injeções ICV-STZ (FIGURA 40) (Densidade óptica: % da média dos controles, aCSF: $100,0 \pm 17,77$; STZ: $526,8 \pm 88,27$, P < 0,0001) (FIGURA 40). O tratamento com a Cafeína foi capaz de diminuir significativamente

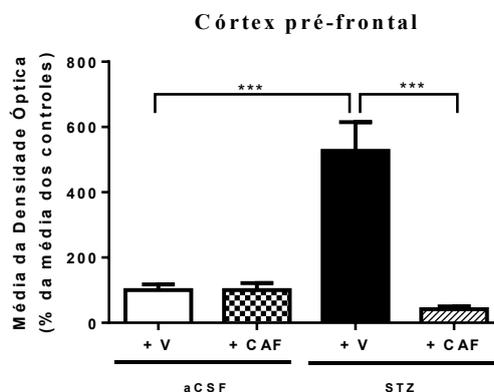
a ativação de astrócitos no córtex pré-frontal em comparação com o grupo de animais submetidos a ICV-STZ. (Densidade óptica: % da média dos controles, STZ+CAF: $41,53 \pm 9,04$, $P < 0,0001$) (FIGURA 40).

Figura 40 - Avaliação da ativação de astrócitos (astroglíose) através da imunomarcagem com o GFAP no córtex pré-frontal de camundongos tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) após a ICV-STZ.

A



B



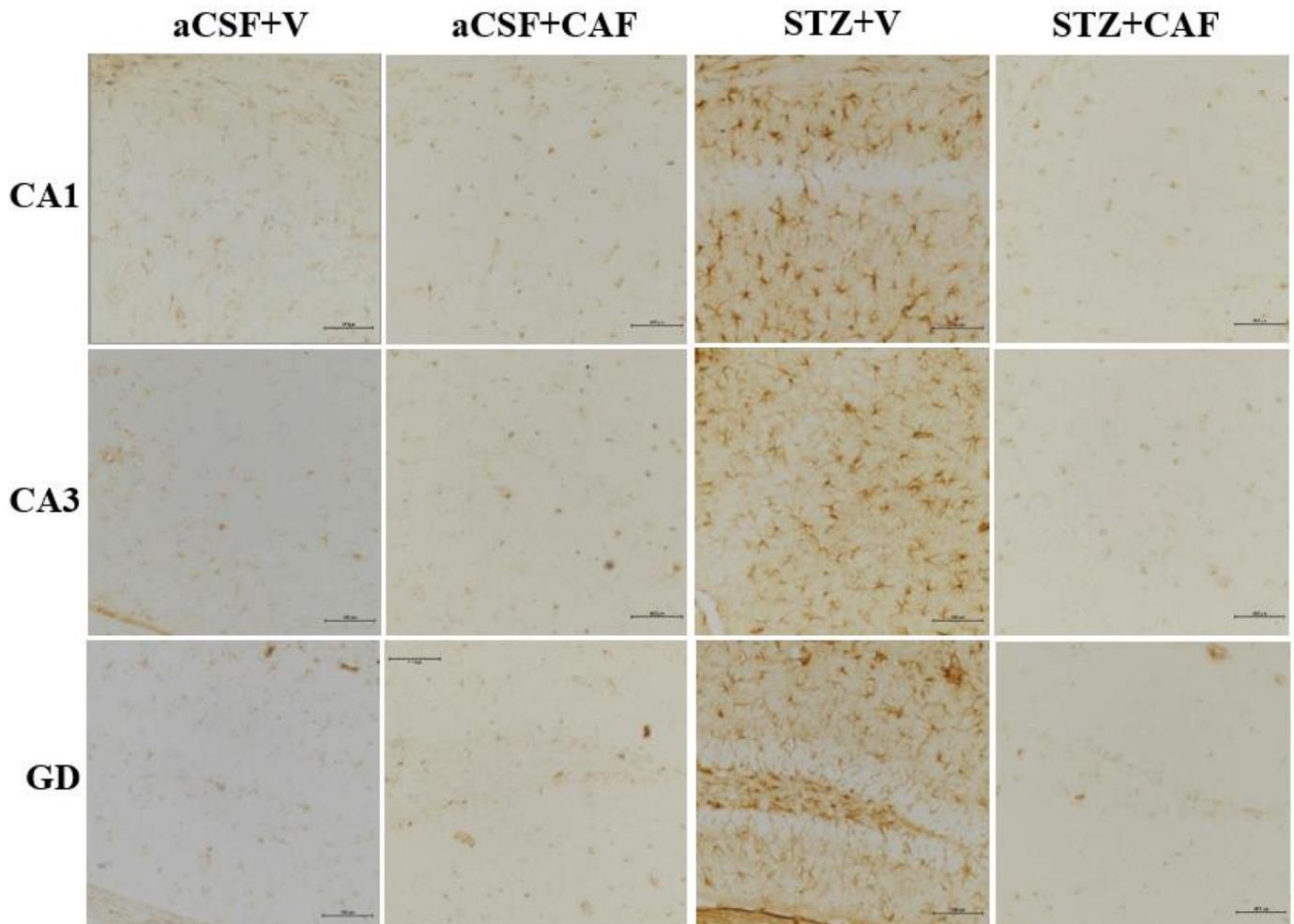
Os animais foram tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) durante 26 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise da imunohistoquímica com o GFAP 26 dias após a ICV-STZ (n = 5-6 animais/grupo, 3 fatias/animal). A) Fotomicrografias representativas do grupo Cafeína (15 mg/kg v.o.) sobre a ativação de astrócitos no córtex pré-frontal. B) Os valores estão representados como média \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0001$. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); CAF (Cafeína). Visualização: microscópio Nikon Elipse E200, com aumento de 200x, escala de 100 μ m.

Foi observado um aumento significativo da ativação dos astrócitos nas regiões CA1, CA3 e DG do hipocampo de animais submetidos a ICV-STZ (FIGURA 41) (Densidade óptica: % da média dos controles, CA1- aCSF: $100,0 \pm 19,12$; STZ: $470,3 \pm 74,97$, $P < 0,0001$; CA3 - aCSF: $100,0 \pm 15,21$; STZ: $341,1 \pm 66,66$, $P < 0,0001$; GD - aCSF: $100,0 \pm 6,52$; STZ: $312,3 \pm 64,30$, $P < 0,001$) (FIGURA 41).

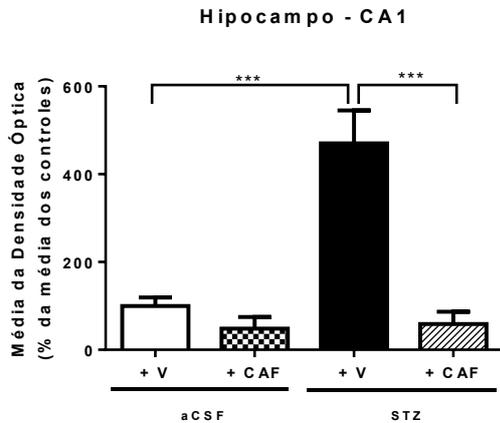
O tratamento com a Cafeína foi capaz de diminuir significativamente a ativação dos astrócitos nas regiões do CA1, CA3 e DG do hipocampo de animais submetidos às injeções ICV-STZ (Densidade óptica: % da média dos controles, CA1 - STZ+CAF: $58,73 \pm 28,12$, $P < 0,0001$; CA3 - STZ+CAF: $67,01 \pm 29,12$, $P < 0,001$; GD - STZ+CAF: $34,47 \pm 7,06$, $P < 0,0001$) (FIGURA 41), havendo uma diminuição significativa da marcação para GFAP nessas regiões.

Figura 41 -Avaliação da ativação de astrócitos (astrogliose) através da imunomarcagem com o GFAP no hipocampo nas regiões CA1, CA3 e GD de camundongos tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) após a ICV-STZ.

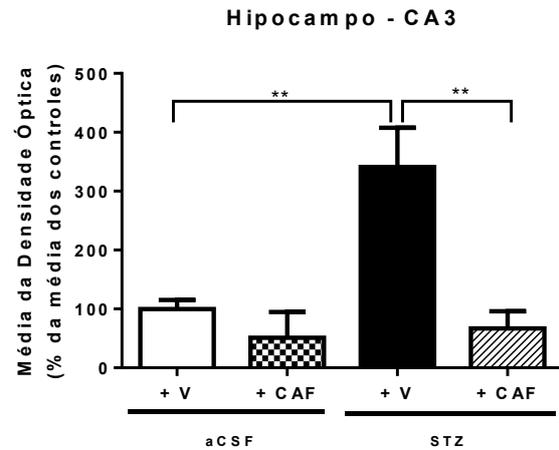
A



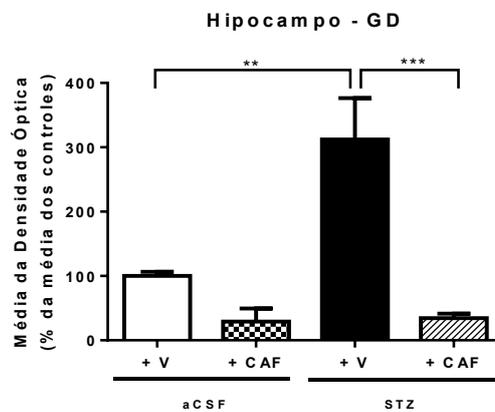
B



C



D



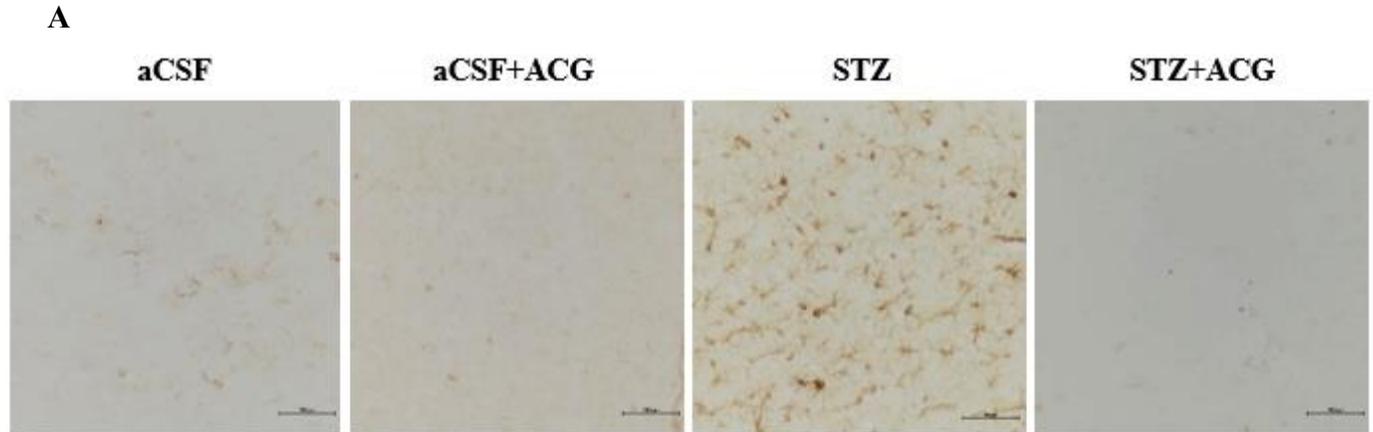
Os animais foram tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) durante 26 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise da imunohistoquímica com o GFAP 26 dias após a ICV-STZ (n = 5-6 animais/grupo, 3 fatias/animal). A) Fotomicrografias representativas do grupo Cafeína (15 mg/kg v.o.) sobre a ativação de astrócitos no Hipocampo, regiões CA1, CA3 e GD. Os valores estão representados como média \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0001$. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); CAF (Cafeína). Visualização: microscópio Nikon Elipse E200, com aumento de 200x, escala de 100 μ m.

7. 16 Efeito do Ácido Clorogênico sobre a ativação das micróglia através da imunomarcção com o Iba-1 no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.

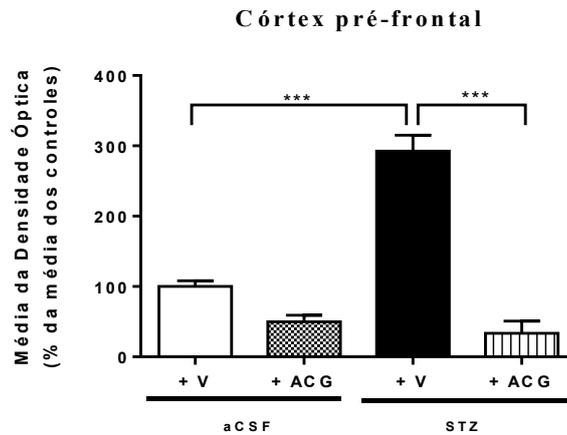
Na avaliação da ativação das micróglia (microgliose) através da imunomarcção com o Iba-1, foi evidenciado ativação no córtex pré-frontal de animais submetidos às injeções ICV-STZ (FIGURA 42) (Densidade óptica: % da média dos controles, aCSF: $100,0 \pm 8,20$; STZ: $292,5 \pm 22,62$, $P < 0,0001$) (FIGURA 42). O tratamento com o Ácido clorogênico foi capaz de diminuir significativamente a ativação das micróglia no córtex pré-frontal em

comparação com o grupo de animais submetidos as injeções ICV-STZ (Densidade óptica: % da média dos controles, STZ+ACG: $33,42 \pm 17,56$, $P < 0,001$) (FIGURA 42).

Figura 42 - Avaliação da ativação das micróglias, através da imunomarcagem com o Iba-1 no córtex pré-frontal de camundongos tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) após a ICV-STZ



B

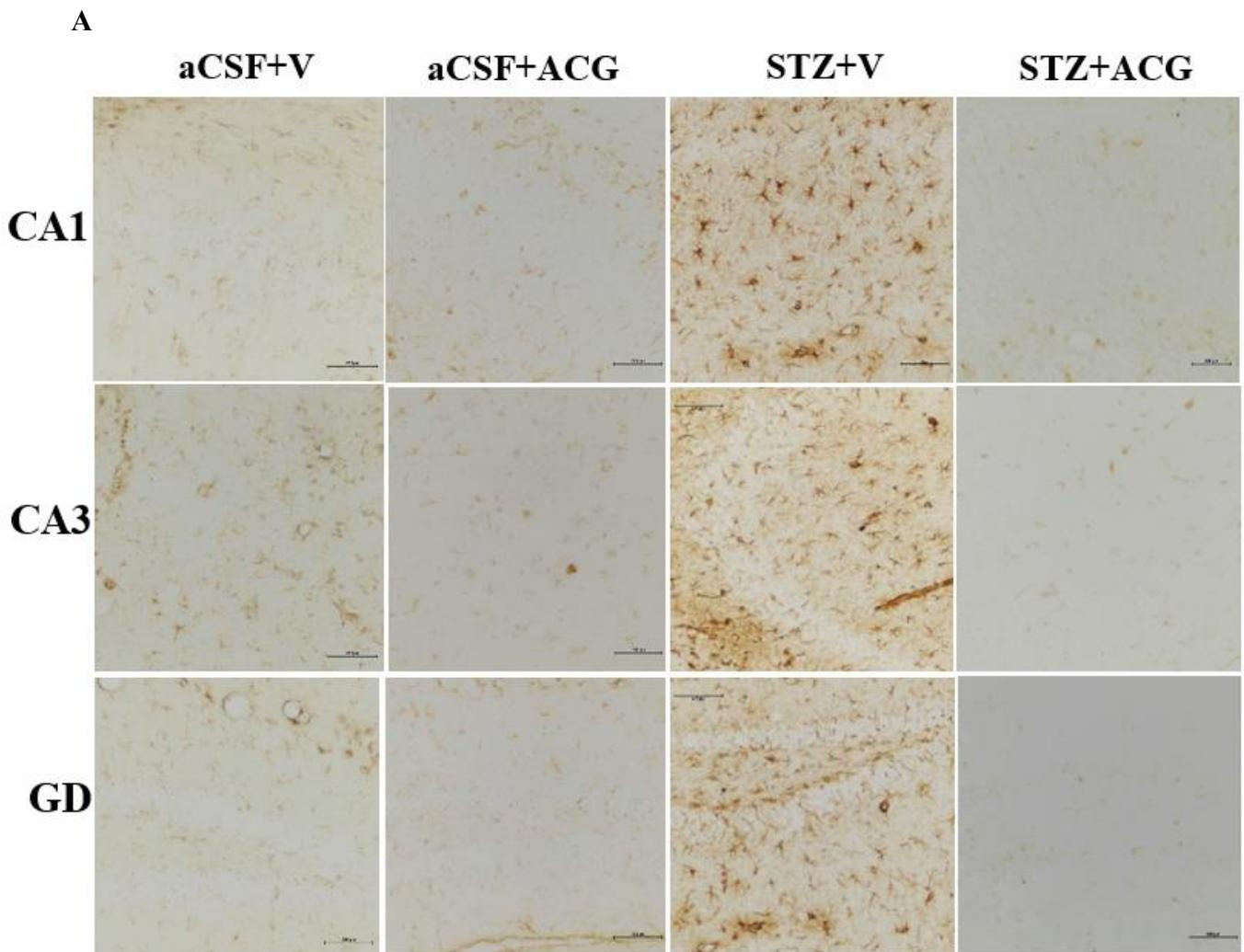


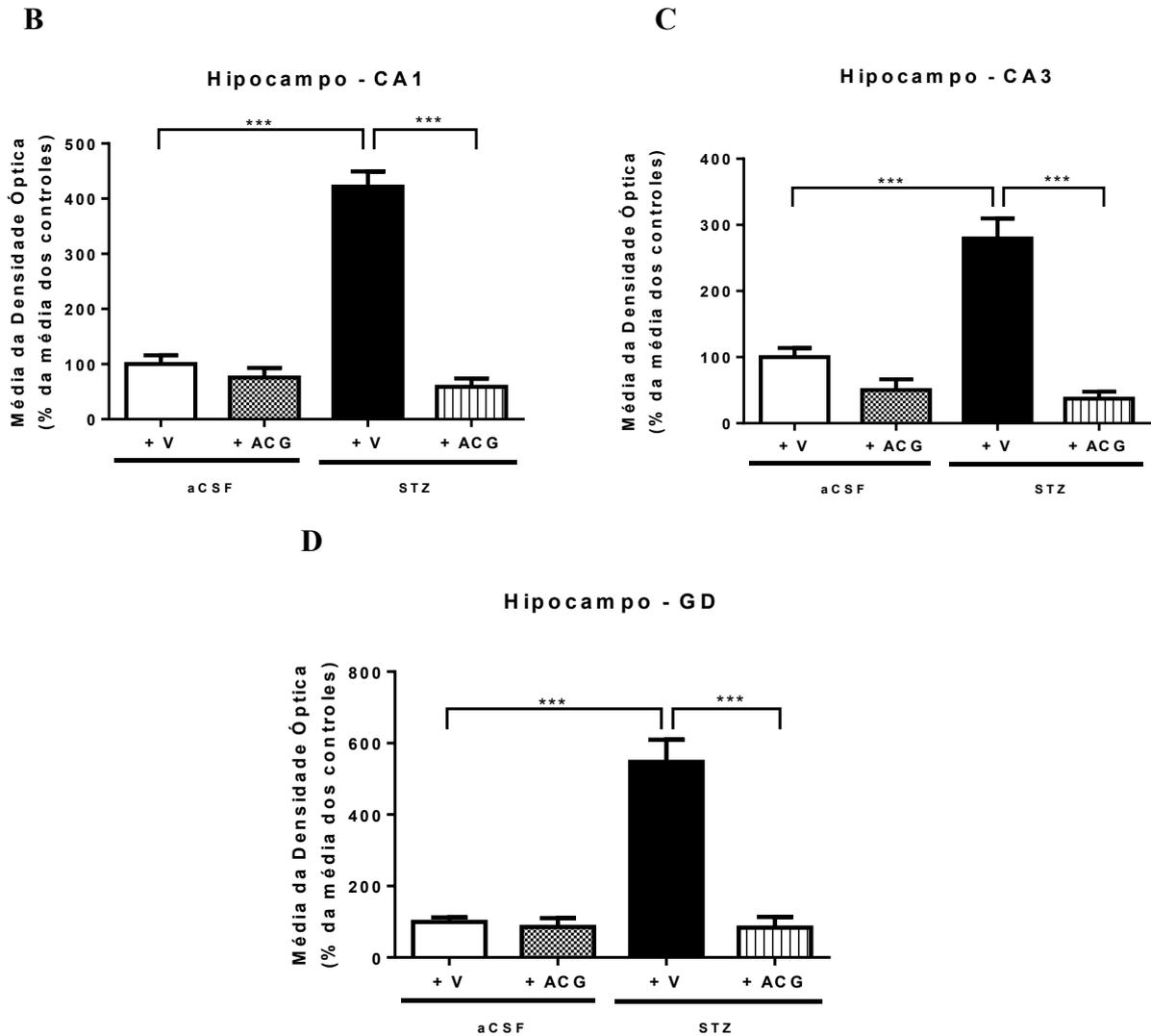
Os animais foram tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) durante 26 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise da imunohistoquímica com o Iba-1 26 dias após a ICV-STZ ($n = 5-6$ animais/grupo, 3 fatias/animal). A) Fotomicrografias representativas do grupo Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) sobre a ativação das micróglias, microgliose, no córtex pré-frontal. B) Os valores estão representados como média \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0001$. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); ACG (Ácido Clorogênico). Visualização: microscópio Nikon Elipse E200, com aumento de 200x, escala de 100 μ m.

Foi observado um aumento da ativação das micróglias nas regiões CA1, CA3 e DG do hipocampo de animais submetidos a ICV-STZ (FIGURA 43) (Densidade óptica: % da média dos controles, CA1- aCSF: $100,00 \pm 16,25$; STZ: $421,8 \pm 27,39$, $P < 0,0001$; CA3 - aCSF: $100,0 \pm 13,89$; STZ: $279,6 \pm 30,11$, $P < 0,0001$; GD - aCSF: $100,0 \pm 12,61$; STZ: $547,7 \pm 61,73$, $P < 0,0001$) (FIGURA 43).

O tratamento com o Ácido clorogênico foi capaz de diminuir significativamente a ativação das micróglias nas regiões do CA1, CA3 e DG do hipocampo de animais submetidos a ICV-STZ (Densidade óptica: % da média dos controles, CA1 - STZ+ACG: $58,97 \pm 14,84$, $P < 0,0001$; CA3 - STZ+ACG: $37,08 \pm 10,68$, $P < 0,0001$; GD - STZ+ACG: $83,60 \pm 29,79$, $P < 0,0001$) (FIGURA 43), havendo uma diminuição significativa da marcação para Iba-1 nessas regiões.

Figura 43 - Avaliação a ativação das micróglias, através da imunomarcação com o Iba-1 no hipocampo nas regiões CA1, CA3 e GD de camundongos tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) após a ICV-STZ





Os animais foram tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) durante 26 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise da imunohistoquímica com o Iba-1 26 dias após a ICV-STZ (n = 5-6 animais/grupo, 3 fatias/animal). A) Fotomicrografias representativas do grupo Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) sobre a ativação das micróglias, microgliose, no Hipocampo, regiões CA1, CA3 e GD. Os valores estão representados como média \pm EPM. *P<0,05; **P<0,005; ***P<0,0001. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); ACG (Ácido Clorogênico). Visualização: microscópio Nikon Elipse E200, com aumento de 200x, escala de 100 μ m.

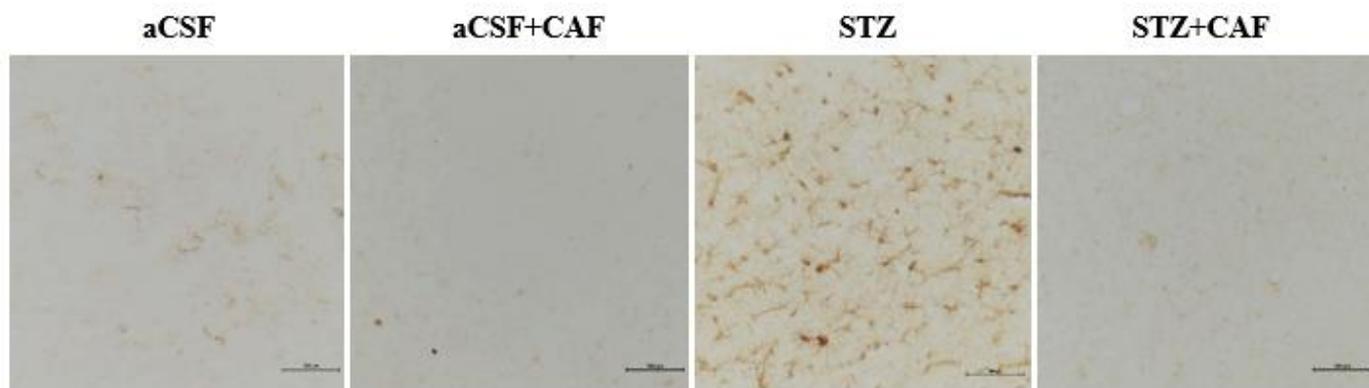
7. 17 Efeito da Cafeína sobre a ativação das micróglias através da imunomarcação com o Iba-1 no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por ICV-STZ.

Na avaliação da ativação das micróglias (microgliose) através da imunomarcação com o Iba-1, foi evidenciado um aumento da ativação das micróglias no córtex pré-frontal de animais submetidos a ICV-STZ (FIGURA 44) (Densidade óptica: % da média dos controles, aCSF: $100,0 \pm 8,20$; STZ: $292,5 \pm 22,62$, P < 0,0001) (FIGURA 44). O tratamento com a

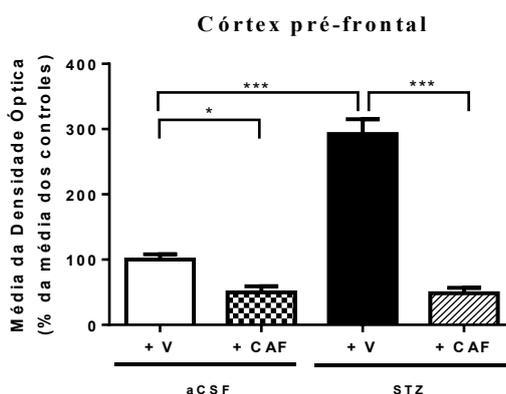
Cafeína foi capaz de diminuir significativamente a ativação das micróglias no córtex pré-frontal em comparação com o grupo de animais submetidos a ICV-STZ (Densidade óptica: % da média dos controles, STZ+CAF: $48,58 \pm 8,40$, $P < 0,0001$) (FIGURA 44).

Figura 44 - Avaliação da ativação das micróglias, através da imunomarcagem com o Iba-1 no córtex pré-frontal de camundongos tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) após a ICV-STZ

A



B



Os animais foram tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) durante 26 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise da imunohistoquímica com o Iba-1 26 dias após a ICV-STZ (n = 5-6 animais/grupo, 3 fatias/animal. A) Fotomicrografias representativas do grupo Cafeína (15 mg/kg v.o.) sobre a ativação das micróglias, microgliose, no córtex pré-frontal. B) Os valores estão representados como média \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0001$. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); CAF (Cafeína). Visualização: microscópio Nikon Elipse E200, com aumento de 200x, escala de 100 μ m.

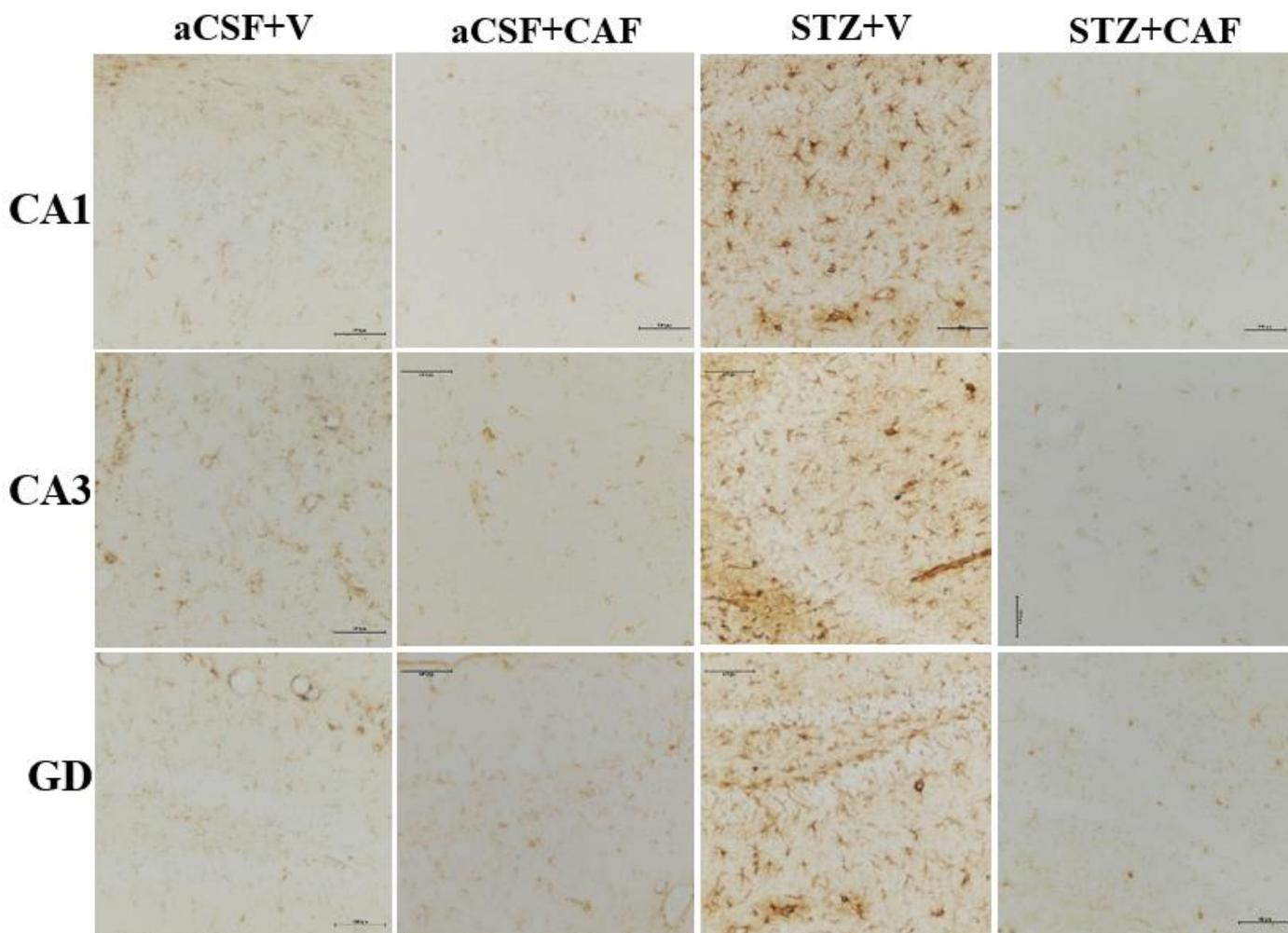
Foi observado um aumento da ativação das micróglias nas regiões CA1, CA3 e DG do hipocampo de animais submetidos a ICV-STZ (FIGURA 45) (Densidade óptica: % da média dos controles, CA1- aCSF: $100,00 \pm 16,25$; STZ: $421,8 \pm 27,39$, $P < 0,0001$; CA3 - aCSF: $100,0 \pm 13,89$; STZ: $279,6 \pm 30,11$, $P < 0,0001$; GD - aCSF: $100,0 \pm 12,61$; STZ: $547,7 \pm 61,73$, $P < 0,0001$) (FIGURA 45).

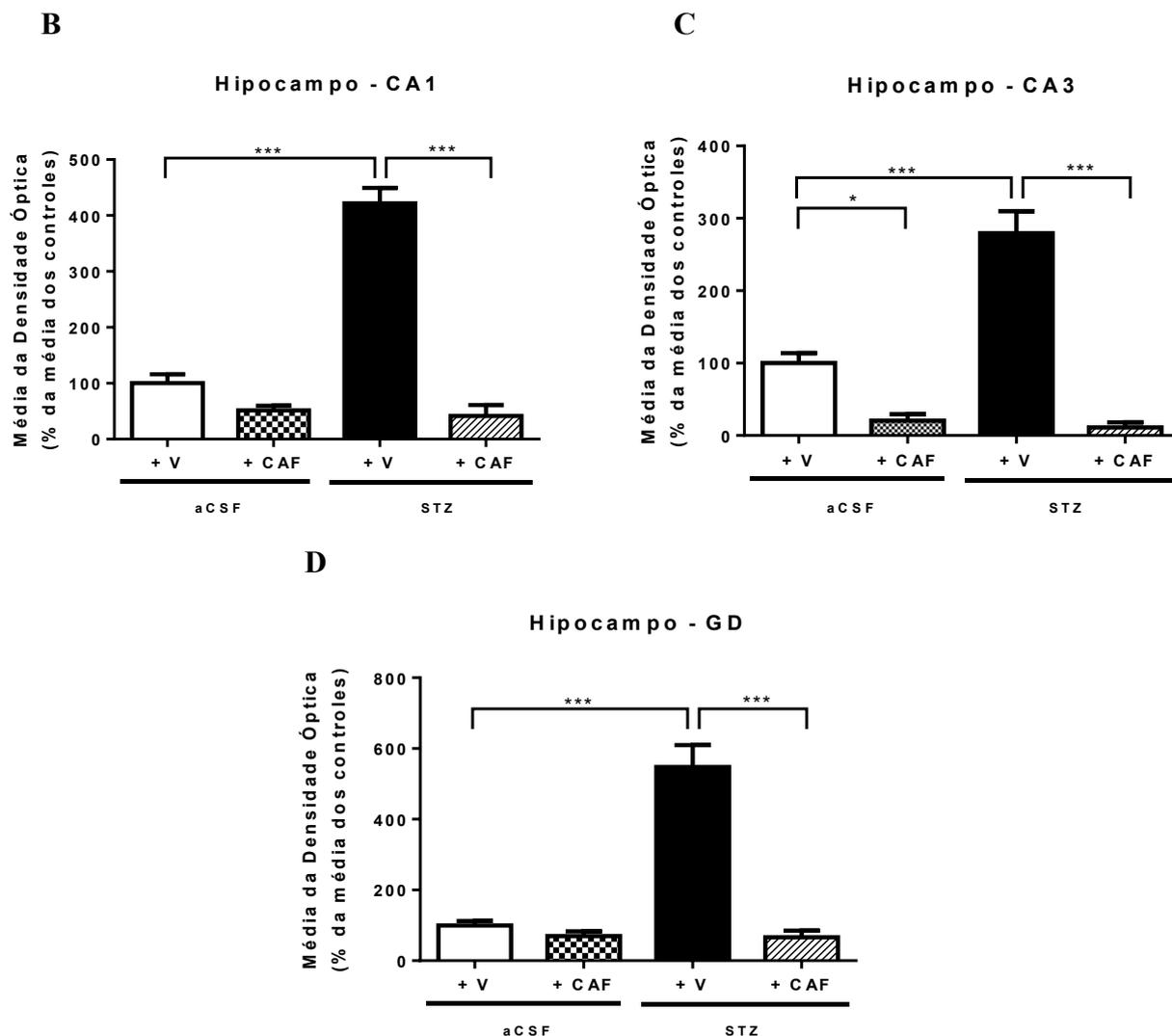
O tratamento com a Cafeína foi capaz de diminuir significativamente a ativação das micróglias nas regiões do CA1, CA3 e DG do hipocampo de animais submetidos a ICV-STZ

(Densidade óptica: % da média dos controles, CA1 - STZ+CAF: $41,61 \pm 19,30$, $P < 0,0001$; CA3 - STZ+CAF: $11,18 \pm 7,04$, $P < 0,0001$; GD - STZ+CAF: $66,47 \pm 18,43$, $P < 0,0001$) (FIGURA 45), havendo uma diminuição significativa da marcação para Iba-1 nessas regiões.

Figura 45 - Avaliação da ativação das micróglias, através da imunomarcagem com o Iba-1 no hipocampo nas regiões CA1, CA3 e GD de camundongos tratados com Cafeína (15 mg/kg v.o.) após a ICV-STZ

A





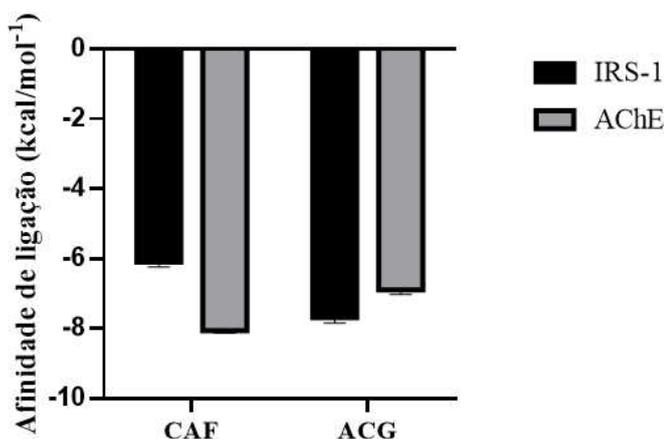
Os animais foram tratados com Ácido Clorogênico (5 mg/kg, v.o.) durante 26 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise da imunohistoquímica com o Iba-1 26 dias após a ICV-STZ (n = 5-6 animais/grupo, 3 fatias/animal). A) Fotomicrografias representativas do grupo Cafeína (15 mg/kg v.o.) sobre a ativação das micróglias, microgliose, no Hipocampo, regiões CA1, CA3 e GD. Os valores estão representados como média \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0001$. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - água destilada v.o.); STZ (Streptozotocina); CAF (Cafeína). Visualização: microscópio Nikon Elipse E200, com aumento de 200x, escala de 100 μ m.

7. 18 Estudo das interações do Ácido Clorogênico e Cafeína com a AChE e IRS-1 usando o Docking Molecular

A Figura 46 exibe o resultado de afinidade (kcal/mol) de todas as atracamentos testados. Observou-se que todas as interações apresentaram dados de afinidade aceitáveis (abaixo de -6,0 kcal/mol) capazes de se ligar firmemente com as macromoléculas-alvo. Os valores médios com desvio padrão dos resultados do *docking* com acetilcolinesterase foram Cafeína -8.0 ± 0.06 kcal/mol, Ácido clorogênico -6.8 ± 0.12 kcal/mol. Nas simulações com o

alvo IRS-1 os resultados foram Cafeína -6.1 ± 0.14 kcal/mol, Ácido clorogênico -7.6 ± 0.17 kcal/mol.

Figura 46 - Representação gráfica (média \pm desvio padrão) das energias de ligação (em kcal/mol) do *docking* molecular entre Cafeína, Ácido Clorogênico, alvos Acetilcolinesterase (AChE) e Receptor de Insulina tipo 1 (IRS1) calculados pelo software AutoDock Vina.



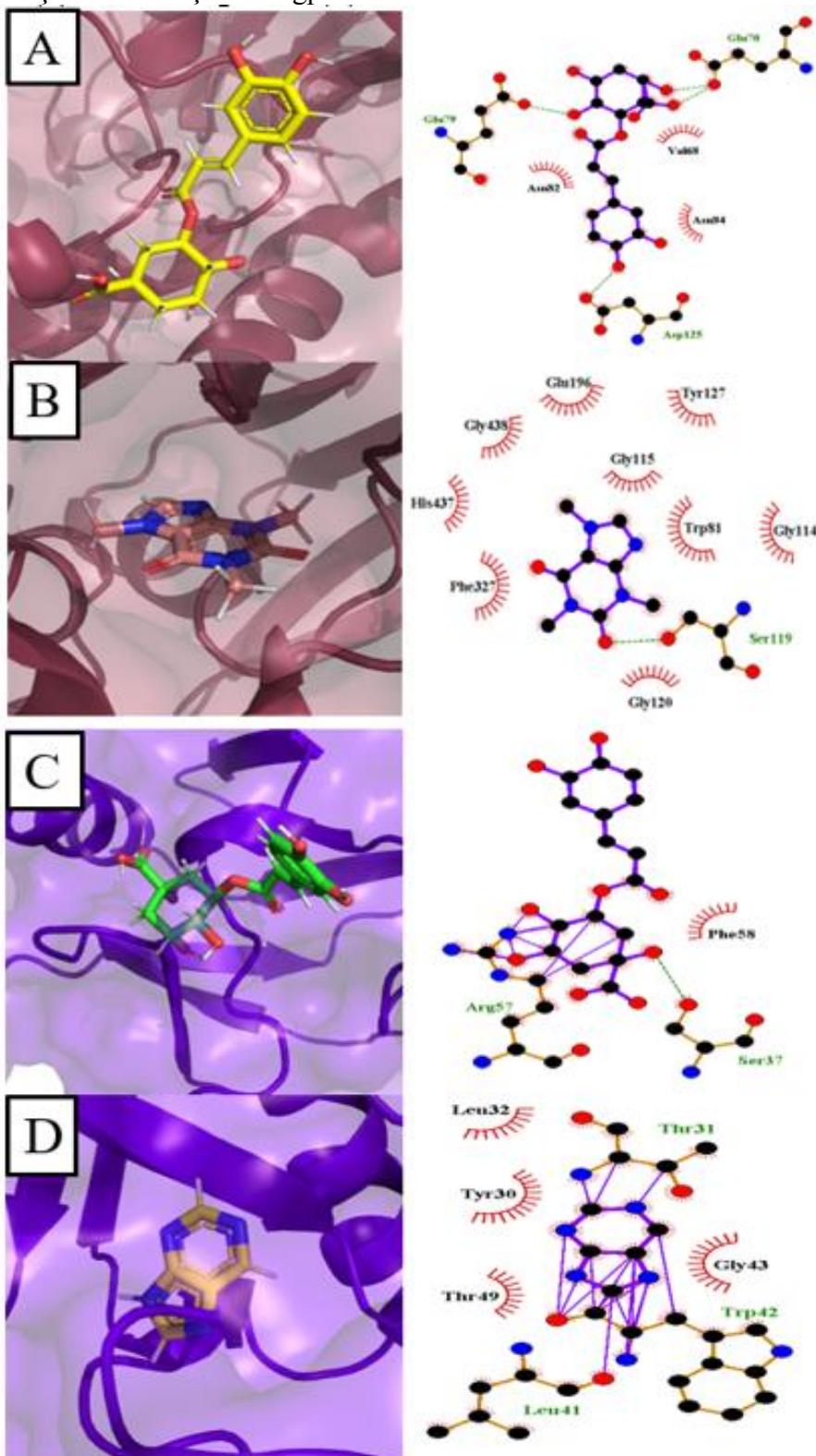
Legenda: IRS- 1 (Receptores de Insulina), AChE (acetilcolinesterase), ACG (Ácido Clorogênico), CAF (Cafeína).

A Figura 47 mostra o resultado da interação entre os ligantes e a estrutura em formato 3D. Foi verificado que os complexos apresentaram formas estruturalmente estáveis sem erros conformacionais. Nas interações bidimensionais com a AChE, observou-se que no complexo formado com a estrutura do ácido clorogênico foi identificado ligações de hidrogênio com os aminoácidos GLU70, GLU79 e ASP125, no complexo formado com a cafeína foi observado uma ligação de hidrogênio com o resíduo SER119 e diversas interações hidrofóbicas.

No complexo com a estrutura alvo da IRS-1 e ácido clorogênico foram observadas ligações de hidrogênio nos resíduos SER37 e ARG57, enquanto com a cafeína foi observado ligações de hidrogênio com os aminoácidos THR31, LEU41 e TRP42 e diversas ligações hidrofóbicas.

Assim, foi possível identificar ligações de alta firmeza (devido as interações de hidrogênio) com diferentes resíduos dos alvos selecionados para esta simulação. Nisto, pode-se observar que o ligante Ácido Clorogênico se encaixou no mesmo bolso de atividade das proteínas bem como a molécula de cafeína, uma estrutura que já tem seu sítio de ligação bastante estudado (POHANKA; DOBES, 2013).

Figura 47 - Representação tridimensional da interação entre (A) Ácido Clorogênico, (B) Cafeína, com a enzima AChE; e interação entre (C) Ácido Clorogênico e (D) cafeína com o IRS-1. Ilustração da interação do ligplot em 2D mostra todos os aminoácidos



As ligações de hidrogênio são representadas como linhas verdes tracejadas; interações hidrofóbicas semicírculo vermelho. (A) Ácido Clorogênico, (B) Cafeína com a enzima AChE; e interação entre (C) Ácido Clorogênico e (D) cafeína com o IRS-1.

Tabela 4 - Resumo dos efeitos do ACG e Cafeína nos diferentes testes realizados nesse estudo

Testes	Comportamento	Córtex	Hipocampo
Campo Aberto	NA		
Y-maze	NA		
Reconhecimento de Objetos	P		
Esquiva Passiva	P		
Labirinto Aquático de Morris	P		
Labirinto em Cruz Elevado	P		
Nitrito/Nitrato		↓	↓
TBARS		↓	↓
Viabilidade Neuronal		↑	↑
BDNF		↑	↑
GFAP		↓	↓
Iba-1		↓	↓
Docking molecular: AChE		IF	IF
Docking molecular: IRS-1		IF	IF

Abreviaturas: P: protegeu; NA: Não tem ação; ↑ Aumentou; ↓ Diminuiu; IF: interagir fortemente

8 DISCUSSÃO

Neste estudo, mostramos o potencial neuroprotetor do ACG e cafeína sobre os déficits cognitivos, diminuição da viabilidade neuronal, diminuição da expressão de BDNF e aumento do estresse oxidativo e neuroinflamação em camundongos submetidos ao modelo DAE induzida por ICV-STZ. Além disso, os estudos *in silico* evidenciaram a presença de ligações de alta firmeza do ACG e Cafeína com sítio de ligação da AChE e IRS-1.

Entende-se que a DA é uma desordem neurológica ainda bastante incompreendida e suas múltiplas vias patológicas contribuem para a complexidade e dificuldade de tratamento e prevenção desta doença. Uma vez que ainda não há cura para a DA, o desafio maior está no desenvolvimento de novas terapias e/ou alvos terapêuticos para cura ou tratamento sintomático da doença.

O modelo de DAE induzido por ICV-STZ causa uma dessensibilização dos Receptores de Insulina (IR), alterando o funcionamento das enzimas envolvidas no metabolismo da glicose cerebral com consequentes alterações bioquímicas e fisiopatológicas semelhantes a algumas das alterações cerebrais observadas durante a DA (AGRAWAL *et al.*, 2011; CHEN, 2017), como estresse oxidativo, neuroinflamação, perda neuronal e comprometimento do aprendizado e da memória (SALKOVIC-PETRISIC; HOYER, 2007; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013).

Na avaliação da atividade locomotora por meio do teste do campo aberto, os resultados obtidos demonstraram que não houve nenhuma alteração significativa entre os grupos em relação à distância percorrida, velocidade média e no número de *crossings* e *rearings*. Estes dados corroboram com estudos que demonstram não haver alteração na atividade locomotora e no comportamento exploratório dos animais que receberam ICV-STZ, excluindo a possibilidade do STZ interferir na atividade locomotora nos testes de memória (PACHECO *et al.*, 2018; BIASIBETTI *et al.*, 2017), e demonstrando que não há déficit motor no modelo animal de DAE. O tratamento com o ACG e a cafeína também não alterou a atividade locomotora dos animais.

Estudos de Fernandes e colaboradores (2021) também evidenciaram que o tratamento com ACG não afetou a atividade locomotora e comportamento exploratório dos animais, no modelo de DA induzida por injeções de A β . Com relação ao tratamento com cafeína, estudos de Teixeira (2015) também demonstraram que o tratamento com cafeína não afetou a atividade locomotora e comportamento exploratório dos animais, no modelo animal de DAE induzido por STZ.

Na avaliação da memória de trabalho, por meio do teste do labirinto em Y, os animais submetidos ao modelo de DAE não apresentaram déficits na memória de trabalho, não havendo diferença significativas na porcentagem de alternâncias espontâneas. Apesar de alguns estudos com o mesmo modelo de ICV-STZ indicarem um déficit na memória de trabalho (QUEIROZ, 2015; SORIAL *et al.*, 2017; GHASEMI-KASMAN *et al.*, 2018; BALDINOTTI *et al.*, 2022; KAWAMURA *et al.*, 2020). Segundo alguns autores, essa diminuição da memória de trabalho pode ser explicada pelos efeitos do STZ nos receptores de insulina, reduzindo a glicose no cérebro e, conseqüentemente, resultando na diminuição de ATP e uma redução na produção de acetilcoenzima A (Acetil-CoA), resultando em déficits na memória (HOYER, 2007; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013).

Como não foram observados alterações na memória de trabalho, não foi possível avaliar o efeito do tratamento com ACG e cafeína neste modelo de ICV-STZ. Entretanto, estudos anteriores com modelo de amnésia induzida por escopolamina, investigaram o efeito do ACG (6 ou 9 mg/kg) na memória de curto prazo ou de trabalho feita através do teste de labirinto em Y, onde foi evidenciado que o tratamento com o ACG demonstrou uma melhora na memória operacional de curta duração (KWON *et al.*, 2010).

Fernandez e colaboradores (2021) no modelo de DA induzida por ICV-A β , observaram o comprometimento da memória de trabalho e da função sináptica, e que o tratamento com o ACG foi capaz de melhorar a memória e atenuar a disfunção sináptica. Outros estudos feitos por Ogut e colaboradores (2022), também evidenciaram uma melhora na memória de trabalho com o tratamento com compostos fenólicos.

Arendash e colaboradores (2009), examinaram o efeito da administração de cafeína (0,3 mg/mL) em camundongos transgênicos (APPsw), que desenvolvem altos níveis de A β cerebral, envelhecidos (18–19 meses) apresentando memória de trabalho prejudicada; após 4–5 semanas de tratamento com cafeína, os roedores foram submetidos ao teste do labirinto em y demonstrando uma melhora cognitiva com o tratamento, também evidenciou que camundongos tratados com cafeína tiveram menor deposição de A β no hipocampo e no cortex entorrinal, por supressão da expressão de β -secretase (BACE1) envolvendo a via inflamarória cRaf-1/NF κ B, diminuindo a expressão de NF κ B e GSK3, reduzindo a produção de A β . É interessante lembrar que a desregulação de GSK-3 α é aumenta a produção de A β , além de aumentar a probabilidade de mutação de PS1, que aumenta a clivagem de γ -secretase da atividade de APP (ZHOU; ZHANG, 2021).

O dano neuronal causado pela administração do STZ pode atingir diferentes regiões, como o septo, regiões do corpo caloso (KRASKA *et al.*, 2012), alterações ao nível do fórnice,

córtex perirrinal, hipocampo anterior e estruturas periventriculares (SHOHAM *et al.*, 2003). O córtex perirrinal é o local de entrada de muitas informações sensoriais como estímulos visuais, olfatórios e somatossensoriais envolvidos no reconhecimento de objetos e, envia impulsos nervosos para o hipocampo (ANTUNES; BIALA, 2012). Essa região está envolvida no reconhecimento de objetos após curtos períodos de intervalo (memória de curto prazo), enquanto o hipocampo é responsável pelo reconhecimento de objetos após longos períodos de intervalo (memória de longa duração). O hipocampo dorsal desempenha um papel importante especialmente quando informações espaciais ou de contexto são um fator relevante (ANTUNES; BIALA, 2012).

Na avaliação da memória de reconhecimento, por meio do teste de reconhecimento de objetos, os animais que receberam ICV-STZ apresentaram déficit na memória de reconhecimento de objetos na exposição após 1 hora e na exposição após 24 horas. Estes resultados corroboram com outros estudos, onde foram observados déficits significativos na avaliação da memória reconhecimento (BASSANI *et al.*, 2017; ROY *et al.*, 2022). A dificuldade na aquisição e retenção de memória neste modelo provavelmente está associada com o prejuízo na sinalização cerebral da insulina no hipocampo induzido pela ICV-STZ (CORREIA *et al.*, 2012; ROSTAMI *et al.*, 2017).

Tem sido sugerido também o papel da neurogênese para a formação de novos neurônios no hipocampo, tendo grande importância na aquisição e consolidação da memória de reconhecimento de objetos (JESSBERGER *et al.*, 2009; SUÁREZ-PEREIRA; CANALS; CARRIÓN, 2015). Alterações no processo de neurogênese em adultos foram evidenciadas em muitos estudos em tecidos *post-mortem* de pacientes acometidos pela DA e em vários modelos animais (BASSANI, 2017).

O tratamento com o ACG e cafeína foi capaz de promover uma melhora significativa no índice de reconhecimento de objeto após a exposição de 1 hora e 24 horas. Estudos de Gao e colaboradores (2020), em um modelo de DA com camundongos transgênicos duplos APP/PS1, mostraram que o ACG possui capacidade de diminuir as perdas neuronais em regiões do hipocampo e diminuir a autofagia, o que justifica uma melhora na memória de reconhecimento de objetos. Além disso, estudos no modelo de DA induzida por ICV-A β tem demonstrado um comprometimento da memória de reconhecimento de objetos relacionado a uma perda da função sináptica no hipocampo, havendo uma melhora significativa da disfunção sináptica após o tratamento com o ACG, diminuindo a toxicidade do A β nas sinapses e melhorando a consolidação da memória (FERNANDEZ *et al.*, 2021).

Uma vez que estudos *in vitro* mostram que o ACG pode atenuar a toxicidade celular geral após a exposição a A β ou glutamato em culturas neuronais (MIKAMI; YAMAZAWA, 2015; REBAI *et al.*, 2017; SHI *et al.*, 2020) ou linhagens celulares semelhantes a neurônios (GRAY *et al.*, 2014), é provável que a capacidade atualmente relatada do ACG de atenuar a disfunção sináptica em fatias do hipocampo de camundongos que receberam A β pode ser uma consequência indireta de uma citoproteção geral proporcionada, em vez de efeitos sinápticos diretos, tendo em vista que não foram observados efeitos diretos do ACG sobre a função sináptica em condições não patológicas, ou seja sem a indução de um modelo patológico (FERNANDEZ *et al.*, 2021).

Em estudos anteriores, foi observada uma melhora no índice de reconhecimento de objetos e um efeito neuroprotetor da cafeína no modelo de DAE induzida por ICV-STZ, além disso, também foi observado o efeito neuroprotetor cafeína impedindo a neurodegeneração no hipocampo induzida por STZ (ESPINOSA *et al.*, 2013; TEIXEIRA, 2015). Botton e colaboradores (2010) constataram uma melhora na memória de reconhecimento em um modelo de DA induzida por escopolamina após o tratamento com cafeína, atribuída ao bloqueio dos receptores de adenosina A1 e A2A. De forma crônica, estudos epidemiológicos também têm mostrado que a cafeína previne o declínio cognitivo associado ao DA e um dos possíveis mecanismos neuroprotetores da cafeína trazidos por esses estudos é que ela estimula a atividade da PKA, resultando na redução da forma hiperativa do c-Raf-1. Essa forma anormal de c-Raf-1 está associada à progressão da DA, pois ativa a via NF- κ B e a expressão da β -secretase, e também atua diminuindo a desregulação da GSK-3 α , o que reduz a mutação PS1 e a expressão da γ -secretase (ZHOU; ZHANG, 2021). A ingestão subcrônica de cafeína também demonstrou uma melhora na memória de reconhecimento e aumentar a fosforilação das proteínas Akt, GSK-3 β e ERK do hipocampo, em camundongos, favorecendo a ativação de Akt e inibição de GSK-3 β (ESMAILI *et al.*, 2021).

Considerando o papel da Akt na formação da memória e na plasticidade sináptica (HORWOOD *et al.*, 2006), existe a possibilidade de que o sinal da Akt esteja envolvido no efeito de melhora da memória da cafeína. Em linha, recentemente foi demonstrado que a fosforilação do substrato do receptor de insulina e a sinalização de Akt estão envolvidas na potencialização de longo prazo (LTP) induzida pela cafeína (LAO-PEREGRÍN *et al.*, 2017). Além disso, a superexpressão de GSK-3 β em camundongos transgênicos demonstrou deteriorar a formação de memória dependente do hipocampo e neurodegeneração (LUCAS *et al.*, 2001). Consequentemente, sugere-se que o GSK-3 β afeta negativamente a plasticidade sináptica, bem como o aprendizado e a memória (JAWORSKI *et al.*, 2019). Assim, a

diminuição da expressão de GSK-3 β total do hipocampo induzida pela cafeína pode contribuir para o seu efeito de melhoria da memória. ERK pertence à família MAPK (mitogen-activated protein kinase) e é sugerido que participe da plasticidade sináptica e formação de memória (ADAMS; SWEATT, 2002). Estudos anteriores mostraram que o aprendizado está associado a aumentos no estado de fosforilação de ERK e que agentes que melhoram a memória aumentaram a fosforilação de ERK no hipocampo nos camundongos (MEDINA; VIOLA, 2018; SOUKHAKLARI *et al.*, 2018). Portanto, existe uma probabilidade de que a fosforilação de ERK tenha um papel no efeito de melhora da memória da cafeína.

Nosso estudo evidenciou uma diminuição da perda de neurônios e possível melhora da integridade neuronal nas áreas do córtex pré-frontal e hipocampo após tratamento com ACG e cafeína. Assim, essa melhora no índice de reconhecimento de objetos pode estar relacionada a proteção frente a perda de neurônios e manutenção da integridade neuronal.

Na avaliação da memória aversiva, através do teste da esQUIVA passiva, os animais submetidos ao modelo de DAE apresentaram déficit na memória recente (MR) e na memória tardia (MT). Esses resultados corroboram com outros estudos que mostraram que o modelo de DAE induzida por ICV-STZ causaram uma diminuição na memória aversiva (LI *et al.*, 2017; GÁSPÁR, *et al.*, 2021; ROY *et al.*, 2022). Além disso, Kim e colaboradores (2016) demonstraram os efeitos neurotóxicos da STZ, como a redução na sinalização da insulina e o acúmulo de A β e proteína Tau no cérebro dos camundongos, resultando em déficits de memória.

O tratamento com ACG protegeu contra o déficit na memória aversiva, na memória tardia (MT). Estudos de Kwon e colaboradores (2010), corroboram com nossos achados, evidenciando uma melhora da memória aversiva após o tratamento com ACG, no modelo de amnesia induzida por escopolamina. Enquanto Lee e colaboradores (2020) mostraram uma melhora após o tratamento com ACG na memória aversiva no modelo de isquemia transitória, e esse efeito protetor se deve, possivelmente, ao aumento das enzimas antioxidantes superóxido dismutases (SODs), SOD1 e SOD2, e de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-13). Estudos tem demonstrado que grupos fenólicos como ACG desagregam e desestabilizam as fibrilas A β e reduzem a citotoxicidade (ONO *et al.*, 2003, 2004; WANG *et al.*, 2008). Dentre as suposições gerais sobre o mecanismo de inibição da formação de fibrilas de proteína amiloide por pequenos compostos polifenólicos, foi observado que os inibidores polifenólicos eficientes são compostos por pelo menos dois anéis fenólicos com ligantes de dois a seis átomos e possuem grupos OH nos anéis aromáticos (PORAT; ABRAMOWITZ; GAZIT, 2006).

O tratamento com a cafeína foi capaz de proteger do déficit tanto na memória recente (MR) quanto na memória tardia (MT). O estudo de Arendash e colaboradores (2009) mostrou a capacidade de melhora cognitiva após o tratamento com a cafeína no modelo de DA por injeções ICV-A β . Neste estudo, foi mostrado que os animais tratados com a cafeína (0,3 mg/ml) tiveram menor deposição de A β no hipocampo (-40%) e córtex entorrinal (-46%) e reduziram os níveis de A β solúvel, evidenciando uma atividade antiamiloidogênica da cafeína, e esta atividade se apresenta relacionada a uma diminuição do estresse oxidativo e a melhora na capacidade cognitiva nos testes de comportamento. O bloqueio dos receptores de adenosina A_{2A}, seja por cafeína ou gene nocaute, diminui a atividade das quinases de fosforilação tau, glicogênio sintase quinase-3 β (GSK-3 β) e proteína quinase A (PKA), reduzindo os déficits cognitivos e neuroinflamação (ZHAO *et al.*, 2017).

Na avaliação da memória espacial, através do teste do labirinto aquático, os animais que receberam ICV-STZ apresentaram déficit na memória espacial, observados através do maior tempo de latência para alcançar a plataforma, menor tempo de permanência no quadrante e menor número de cruzamentos no local onde se encontrava a plataforma e entradas no quadrante, corroborando com trabalhos anteriores (KUMAR; SINGH, 2017; GHASEMI-KASMAN *et al.*, 2018; TOSTAMI *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2022; SORIAL *et al.*, 2017; ROSTAMI *et al.*, 2017).

Estudos evidenciam que lesões hipocámpicas resultam em déficits na aquisição e retenção da memória espacial (RAMOS, 2013; BASSANI *et al.*, 2017; ROSTAMI *et al.*, 2017). Além disso, uma possível explicação para esse declínio cognitivo é a deficiência no metabolismo energético e a reduzida disponibilidade de ATP no cérebro, causadas pelo STZ. Essa condição é responsável pela diminuição na produção tanto de Acetil-CoA quanto de colina-acetiltransferase (ChAT), que são essenciais para a síntese de acetilcolina. Esse desequilíbrio prejudica os mecanismos necessários para a formação da memória devido a uma redução na transmissão sináptica (SZUTOWICZ *et al.*, 2013; LESTER-COLL *et al.*, 2006; TOTA *et al.*, 2011).

O tratamento com o ACG e cafeína protegeu contra os déficits na memória espacial, promovendo uma melhora dos parâmetros avaliados. Estudos anteriores com modelo de amnésia induzida por escopolamina, investigaram o efeito do ACG (6 ou 9 mg/kg) na memória espacial, onde foi evidenciado que o tratamento com o ACG protegeu contra o déficit na memória espacial (KWON *et al.*, 2010). No estudo realizado por Han e colaboradores (2010), foi observado que o tratamento com ACG (6,7 mg/kg) foi capaz de

melhorar a memória espacial, no modelo de camundongos propensos à senescência acelerada (SAMP) que exibem deterioração relacionada à idade no aprendizado e na memória.

Arendash e colaboradores (2006) mostraram que o tratamento com a cafeína (1,5 mg) protegeu contra o déficit na memória espacial, em um modelo de DA usando camundongos transgênicos. Laurent e colaboradores (2014) também corroboram com nossos resultados, ao demonstrarem que a cafeína (0,3 g/L) foi capaz de melhorar a memória espacial, no modelo de camundongo transgênico THY-Tau22 de patologia tau semelhante à DA progressiva.

O mecanismo de ação pelo qual o ACG e a cafeína promoveram a melhora dos déficits de memória ainda não está bem elucidado, mas vale destacar, que seu efeito neuroprotetor está intimamente relacionado com seu potencial antioxidante e anti-inflamatório, que foi comprovado em outros estudos, que demonstraram diminuição da perda neuronal no córtex e no hipocampo, pelo tratamento com ACG e da cafeína, juntamente com a atividade anti-amiloidogênica (WANG *et al.*, 2014; WEI *et al.*, 2016; ARENDASH *et al.*, 2006; 2009; M YELANCHEZIAN *et al.*, 2022). Como no hipocampo há a presença de transportadores de glicose (GLUT 2), esse torna-se um alvo fácil da STZ, resultando em neurotoxicidade e estresse oxidativo. Outros estudos tem evidenciado que o mecanismo de ação da cafeína pode estar relacionado com a regulação positiva de A2A causada pela cafeína (ESPIONSA *et al.*, 2013; FABIANI *et al.*, 2018). Além disso, existe uma associação inversa entre o consumo de cafeína e a incidência da DA (DALL'IGNA *et al.*, 2007).

Para avaliar o possível comportamento ansioso-símile das injeções ICV-STZ nos animais, foi utilizado o teste do labirinto em cruz elevado, 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). Não foram observadas alterações comportamentais relacionadas a ansiedade, corroborando com estudos de Silva e colaboradores (2018) que também não evidenciaram alterações relacionadas à ansiedade no modelo de DAE induzido por ICV-STZ. Resultados de Roy e colaboradores (2022), demonstraram que, no modelo de DAE induzido por ICV-STZ, a presença de alterações comportamentais relacionadas a ansiedade são dependentes do tempo, sendo observados após 60 dias.

O tratamento com o ACG e cafeína não teve efeito sobre o comportamento do tipo ansioso, o que corrobora com os achados de outras pesquisas que também não observaram alterações na função sensorio-motora ou no nível de ansiedade após o tratamento com a cafeína em um modelo de DA usando camundongos transgênicos (ARENDASH *et al.*, 2006;

HEITMAN *et al.*, 2017). A cafeína é bem conhecida por promover comportamento ansioso em humanos e modelos animais, por isso a realização deste teste também foi importante. Já o efeito ansiolítico do ACG foi demonstrado em um estudo com extrato da planta *Valeriana jatamansi*, diminuindo o efeito ansiogênico nos animais (WANG *et al.*, 2021).

Neste estudo, realizou-se a medição dos níveis de glicose em todos os animais, sem qualquer restrição alimentar, antes dos procedimentos de indução e imediatamente antes da eutanásia, para confirmar a ausência de diabetes nos animais. Os resultados obtidos revelaram a ausência de quaisquer variações nos níveis de glicose antes e após os procedimentos de indução, que envolveram ACG, cafeína e/ou ICV-STZ, nos grupos experimentais analisados neste estudo. Além disso, constatou-se que os níveis de glicemia dos animais permaneceram abaixo de 200 mg/dL, o que é considerado o limite para classificar um animal como diabético.

A não alteração nos níveis de glicose com as injeções ICV-STZ corrobora com outros estudos como o de Pacheco e colaboradores (2018) e Bassani (2017), demonstrando não haver influência da STZ no nível basal da glicose sanguínea a nível periférico e, conseqüentemente, não induzindo a Diabetes Mellitus, alterando o metabolismo da glicose e gerando uma resistência insulínica apenas no cérebro (SALKOVIC-PETRISIC; HOYER, 2007, 2013; LEE; LEE, 2017). Este estado de resistência de insulina cerebral, induzido pela ICV-STZ, vem sendo associado às mudanças morfológicas, moleculares e comportamentais que ocorrem na DAE (LESTER-COLL *et al.*, 2006; KAMAT, 2015).

Estudos feitos por Stefanello e colaboradores (2014), demonstrou que os extratos e compostos do café, como ACG e cafeína, protegem o SNC das alterações induzidas pela hiperglicemia, no modelo de Diabetes em ratos, regulando o metabolismo da glicemia, evidenciando o efeito de modulação da glicemia por esses compostos. Acredita-se que o ACG e a cafeína regulem positivamente as funções do IRS-1, modulando a atividade de PI3K, Akt e o transporte de glicose, o que contribui para o controle da glicemia (CHEN *et al.*, 2019; SHI *et al.*, 2020; ESMAILI *et al.*, 2021). Foi evidenciado que o ACG e a cafeína promoveram significativamente o consumo de glicose em células 3T3-L1 resistentes à insulina induzidas por dexametasona, em um modelo resistência à insulina *in vitro*, melhorando a resistência à insulina em adipócitos, regulando positivamente a expressão gênica do substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1), PI3K, AKT e transportador de glicose 4 (GLUT4) (WU *et al.*, 2023).

À medida que os seres humanos vivem mais tempo, é essencial compreender a base neurológica do declínio cognitivo relacionado à idade. Os idosos frequentemente apresentam déficits cognitivos, incluindo dificuldades em tarefas complexas, recordação de palavras,

memória episódica e velocidade de processamento (TOEPPER, 2017). Estudos de ressonância magnética revelaram que essas alterações cognitivas estão associadas a uma diminuição do peso cerebral, aumento da hiperintensidade da substância branca, aumento dos ventrículos laterais e leve atrofia volumétrica regional (HEDMAN *et al.*, 2012). Além disso, são observadas alterações modestas em neurônios, espinhas dendríticas, sinapses e neurotransmissores, juntamente com aumento da ativação glial, redução do fluxo sanguíneo cerebral e enfraquecimento da barreira hematoencefálica (HEPPNER *et al.*, 2015).

Na DA, a disfunção cognitiva e a perda progressiva de memória estão associadas à degeneração do hipocampo (KIM *et al.*, 2022). Novas evidências indicam que o estresse oxidativo acumulado pode desempenhar um papel fundamental no envelhecimento cognitivo e nas doenças neurodegenerativas, como a DA (IONESCU-TUCKER; COTMAN, 2021; BAI *et al.*, 2022). Nas mitocôndrias do cérebro afetado pela DA, observa-se uma diminuição do potencial de membrana, interrompendo a cadeia de transferência de elétrons, o que resulta em uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), prejudicando o sistema de transporte de elétrons mitocondrial, interrompendo suas funções enzimáticas antioxidantes, SOD1 e SOD2, causando um aumento adicional nos níveis de EROs que finalmente ativam a caspase e desequilíbrio na homeostase do cálcio citosólico e acúmulo de A β , culminando em neurodegeneração (NAOI *et al.*, 2019; ZHOU; ZHANG, 2021).

Assim, o estresse oxidativo tem sido correlacionado ao surgimento e avanço da DA (FISCHER; MAIER, 2015; KIM *et al.*, 2015), pois pode provocar danos aos lipídios na membrana, interferir nas enzimas essenciais para a função neuronal e glial, e causar danos estruturais ao DNA. Isso resulta em lesões nos tecidos, disfunção sináptica e eventual morte celular (HUANG *et al.*, 2016). Pesquisas têm indicado que a infusão de STZ leva a déficits de memória em roedores, um efeito atribuído ao aumento do estresse oxidativo originado de sua decomposição, que resulta na formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e óxido nítrico, (KWON *et al.*, 1994) isso desencadeia um processo de neuroinflamação crônica e lesões neuronais, onde tanto o estresse oxidativo quanto a apoptose podem ter papéis cruciais na neurodegeneração e nos danos ao metabolismo energético cerebral (NAZEM *et al.*, 2015; RAJASEKAR *et al.*, 2014).

A disfunção dos IRs também leva a uma diminuição no metabolismo energético cerebral, resultando em estresse oxidativo. Isso se manifesta em comprometimentos cognitivos, em parte devido à inibição na produção de ATP e acetil-CoA, entre outros fatores (ISHRAT *et al.*, 2006). A disfunção dos IRs também leva a uma diminuição no metabolismo energético cerebral, resultando em estresse oxidativo. Isso se manifesta em

comprometimentos cognitivos, em parte devido à inibição na produção de ATP e acetil-CoA, entre outros fatores (ISHRAT *et al.*, 2006).

A presença de estresse oxidativo foi encontrada no córtex e região do hipocampo, com início em uma semana após a administração de ICV-STZ em ratos (PATHAN *et al.*, 2006). Foram notadas alterações significativas nos indicadores de dano oxidativo e uma redução nos níveis de ATP no hipocampo e córtex cerebral durante um período de 2 a 3 semanas após a administração de ICV-STZ (ISHRAT, HODA, *et al.*, 2009). A amplificação da produção de radicais livres e o subsequente estresse oxidativo são amplamente documentados como causadores de dificuldades no aprendizado e na memória, resultando em disfunção cognitiva (ISHRAT, HODA, *et al.*, 2009). Para além dos efeitos do estresse oxidativo, a aplicação de ICV-STZ também está relacionada a certas mudanças morfológicas cerebrais, incluindo a perda extensiva de células, neurodegeneração e a presença de astrogliose, observadas uma semana após o tratamento. Isso ocorre independentemente da idade dos animais (SONKUSARE *et al.*, 2005).

Estudos tem demonstrado haver uma desregulação em enzimas importantes para diminuição do estresse oxidativo, como a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR), no modelo de DAE por STZ (PACHECO *et al.*, 2018; KUMAR; SINGH, 2017). É relatado na literatura que o estresse oxidativo mediado pela ICV-STZ geralmente aumenta os níveis de malondialdeído (MDA), e diminui os níveis de glutathione (GSH), um antioxidante endógeno que elimina os radicais livres e protege contra o estresse oxidativo e nitrosativo, além de queda no nível de ATP, e disfunção mitocondrial, além de danos à bainha de mielina, levando a uma disfunção cognitiva (SIMS-ROBINSON *et al.*, 2013; SHOHAM *et al.*, 2003; KAMAT *et al.*, 2015; SAXENA *et al.*, 2008; ISHRAT *et al.*, 2009; AWASTHI *et al.*, 2010; ALIKHANI *et al.*, 2011). Sendo encontrados alterações nos períodos de 1 e 8 semanas após uma única dose de 3mg/kg ICV-STZ (SHOHAM *et al.*, 2003).

Em nosso estudo, foi observado que os animais que receberam ICV-STZ apresentaram níveis aumentados de nitrito/nitrato e de MDA, no córtex hipocampo, corroborando com estudos anteriores, que utilizaram o mesmo modelo de DAE induzido por ICV-STZ (PACHECO *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2017; KAMAT *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2018; RAI *et al.*, 2014). 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).

A composição química da STZ sugere que esse composto pode originar radicais livres intracelulares, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio (RAI *et al.*, 2014). Essas substâncias podem desencadear uma sequência de mudanças bioquímicas e estruturais, incluindo redução no suprimento de glicose aos neurônios, disfunção mitocondrial, diminuição de ATP, e ativação de astrócitos e micróglia. Esses efeitos combinados podem desencadear uma cascata de eventos, incluindo a formação de radicais livres, liberação de mediadores inflamatórios, hiperfosforilação da proteína Tau e agregação de peptídeo A β , resultando em estresse oxidativo, neuroinflamação e morte celular (DESHMUKH *et al.*, 2009; MEHAN *et al.*, 2011).

O tratamento com o ACG e cafeína protegeu contra o aumento da concentração de nitrito e MDA em ambas as áreas cerebrais, córtex e hipocampo. Demonstrando que o efeito antioxidante do ACG e cafeína pode estar envolvido no seu efeito neuroprotetor contra o dano oxidativo induzido pela injeção ICV-STZ.

Como a maioria dos polifenóis, o ACG foi descrito como potente antioxidante (MIAO; XIANG, 2020) e vários estudos mostraram a capacidade do ACG de afetar a função cerebral combatendo a formação de radicais livres e diminuindo a morte neuronal (KWON *et al.*, 2010; KATO *et al.*, 2018; SAITOU *et al.*, 2018; GAO *et al.*, 2020). Um estudo recente descobriu que o ACG tem um efeito antioxidante muito forte e pode acelerar o reparo de feridas em ratos diabéticos. ratos sem afetar os níveis de superóxido dismutase e catalase (KIM *et al.*, 2018). Além disso, foi descoberto que os grupos hidroxila (OH) em sua estrutura atuam como porções positivas para suas propriedades antioxidantes (NATELLA *et al.*, 1999).

O estudo de Cho e colaboradores (2009), mostrou que o ACG (1 e 5 M) foi capaz de diminuir a morte de células PC12 induzida por peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A apoptose induzida pelo estresse oxidativo está intimamente relacionada à disfunção mitocondrial. O estresse oxidativo induzido por EROs, como H₂O₂, aumenta a permeabilidade mitocondrial, levando à liberação de citocromo c e a subsequente ativação de caspases, as caspases são proteases de cisteína que medeiam a morte celular, e a caspase-3 demonstrou ser um importante regulador da apoptose neuronal (MATTSON, 2000).

Com o modelo de isquemia transitória, Lee e colaboradores (2020), mostraram que o pré-tratamento experimental com ACG previne o declínio cognitivo induzido por isquemia transitória e o dano neuronal no hipocampo por meio de efeitos anti-oxidativos, aumentando enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, SOD1 e SOD2. Com base em estudos prévios *in vitro* que mostraram que o ACG pode atenuar a toxicidade celular geral após a exposição a A β ou glutamato em neurônios cultivados (MIKAMI; YAMAZAWA, 2015; REBAI *et al.*, 2017) ou linhas celulares semelhantes a neurônios (GRAY *et al.*, 2014), devido

a sua grande capacidade antioxidante, que é atribuído a ligações duplas e grupos hidroxila em sua estrutura, mantendo o potencial de membrana mitocondrial, eliminando a produção endógena de EROs e aumentando a níveis de atividade de SOD.

Estudos anteriores com modelo de amnésia induzida por escopolamina, demonstrou o o efeito antioxidante do ACG (3, 6 ou 9 mg/kg), onde o ACG reduziu significativamente os níveis de MDA no córtex frontal e hipocampo, evidenciando também de melhora cognitiva nos testes de memória (KWON *et al.*, 2010). A diminuição da peroxidação lipídica, medida por meio dos níveis de MDA, também foi observada no estudo de Silva e colaboradores (2004), foi avaliado o papel neuroprotetor de um extrato etanólico de *Hypericum perforatum* no modelo de DA induzida pelo peptídeo β -amilóide em neurônios do hipocampo cultivados de ratos. Esse extrato foi caracterizado e foi observada a sua composição rica em compostos fenólicos do tipo ACG (SILVA *et al.*, 2004).

Gul e colaboradores (2016) também mostraram que o ACG possui atividade antioxidante, sendo capaz de diminuir os níveis de MDA e espécies reativas de oxigênio (EROs) em alterações induzidas por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em fatias cerebrais de ratos (GUL *et al.*, 2016). No modelo de diabéticos tipo 1 em ratos tratados com ACG (5 mg/kg), foi observada uma redução nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e nos níveis de hidroperóxido, bem como um aumento nas atividades das enzimas antioxidantes no fígado e nos rins (KARTHIKESAN *et al.*, 2010).

A cafeína demonstra efeitos benéficos no sistema antioxidante, incluindo a inibição da peroxidação lipídica, a redução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), eficaz eliminador de radicais hidroxila (OH) e na diminuição de citocinas pró inflamatórias e de GSK-3 β ; e na melhoria da função mitocondrial, além de aumentar as atividades da catalase, superóxido dismutase (SOD) e aumentar os níveis totais de GSH, no hipocampo (STEFANELLO, 2019; LEÓN-CARMONA *et al.*, 2011; GOMAA *et al.*, 2022).

Esses efeitos podem ser atribuídos à interação da cafeína com os receptores de adenosina, que estão envolvidos na regulação da produção de EROs, como sugerido por estudos anteriores (ALMEIDA *et al.*, 2003). Complementando essa ideia, a administração de cafeína foi capaz de proteger contra o comprometimento da memória relacionado ao envelhecimento e reduzir o estresse oxidativo por meio da modulação dos receptores de adenosina em cérebros de ratos idosos (LEITE *et al.*, 2011). Estudos encontraram uma associação entre o consumo diário de café na meia-idade e uma redução do risco de DA em pacientes idosos, bem como menor risco de desenvolvimento de lesões neuropatológicas da DA (ESKELINEN *et al.*, 2009; GELBER *et al.*, 2011; ZHOU; ZHANG, 2021). Os dados dos

estudos em humanos não permitem concluir de fato sobre o papel da cafeína na modulação do risco de DA. No entanto, há evidências crescentes sobre os efeitos benéficos da cafeína na cognição e no desenvolvimento da DA provenientes de numerosos estudos experimentais (LONDZIN *et al.*, 2021).

A DA é caracterizada pela presença de placas amiloides extracelulares compostos pelo peptídeo A β (WALSH *et al.*, 2002; CLEARY *et al.*, 2005). A inibição da oligomerização e a prevenção da morte celular induzida pelo A β são alvos potenciais para o desenvolvimento de terapias contra a DA (SHANMUGANATHAN *et al.*, 2015, 2018). O peptídeo A β também está associado a apoptose neuronal na DA (ZHI-KUN *et al.*, 2012). Estudos demonstraram que alterações patológicas no modelo de DA induzido por STZ ocorrem em diferentes fases, incluindo uma fase aguda (1 a 3 meses), uma fase compensatória (6 a 9 meses) e uma fase descompensatória, com um declínio progressivo na fase crônica (KNEZOVIC *et al.*, 2015).

Estudos utilizando o modelo de DAE por ICV-STZ indicam que a formação de placas A β ocorre após um mínimo de 3 meses das injeções ICV-STZ (SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2006). No entanto, evidências mostram um aumento significativo da expressão da proteína A β no hipocampo aos 14 dias após a administração de STZ, diminuindo no dia 21 (RAVELLI *et al.*, 2016). Isso sugere que o acúmulo de placas A β no hipocampo, área importante para a memória, pode estar relacionado ao declínio da função cognitiva característico da DAE (REITZ *et al.*, 2009; ABDIPRAONTO *et al.*, 2008; VILLEMAGNE *et al.*, 2017).

Rajasekar e colaboradores (2014) relataram que STZ induz a expressão de proteína amiloidogênica e aumenta a expressão de APP, BACE-1 e A β 1-42 em astrócitos, e essas características patológicas são encontradas no cérebro de pacientes com DAE. Greenfield e colaboradores (1999) relataram que a ICV-STZ também causou aumento significativo no tamanho do aparelho de Golgi, o que pode influenciar o processamento proteolítico de proteínas precursoras de A β (β -APP) geradas no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi que acumulada no cérebro com DA.

A autofagia desempenha um papel importante no metabolismo do A β e no processamento e depuração da proteína Tau na DA. A progressão do acúmulo de placa A β e a hiperfosforilação das proteínas Tau são potencializadas pelo estresse oxidativo (GAO *et al.*, 2021). Estudos também demonstram que compostos fenólicos como ACG desagregam as fibrilas A β , reduzem a toxicidade e bloqueiam a oligomerização A β , sugerindo seu potencial terapêutico no tratamento da DA (ONO *et al.*, 2003, 2004; WANG *et al.*, 2008; HAMAGUCHI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2014; ISHIDA *et al.*, 2020; MIYAMAE *et al.*, 2012). Um estudo biológico *in vitro* revelou que o ACG tem um efeito inibitório aprimorado

na agregação de A β 40 e protege as células PC12 da morte celular induzida pela agregação de A β (YANG *et al.*, 2018).

Além disso, a administração prolongada de cafeína tem sido associada à melhora da memória, reduzindo os níveis de A β e suprimindo as enzimas produtoras de A β (ARENDASH *et al.*, 2009; CAO *et al.*, 2011). A inibição da enzima AChE não só aumenta a neurotransmissão colinérgica no cérebro, mas também ajuda a reduzir a agregação de A β , um fator chave na DA (REES *et al.*, 2003). Os efeitos neuroprotetores de cafeína sobre DA é provavelmente devido à capacidade da substância de suprimir β - e γ -secretase, que são ambas as enzimas necessárias para a formação de A β no cérebro, e de fato sua administração crônica ou aguda reduz níveis de A β no plasma e no cérebro em modelos de camundongos transgênicos, bem como reversão da sua neuropatologia (ARENDASH; CAO, 2010) e prevenção da acumulação de A β dentro e em torno de vasos sanguíneos cerebrais (CAPPELLETTI *et al.*, 2015).

Na avaliação da integridade neuronal, através da coloração com o cresil violeta, foi evidenciada morte neuronal no córtex pré-frontal e nas regiões do CA1 e CA3 do hipocampo de animais submetidos a ICV- STZ, corroborando com os estudos de Biswas e colaboradores (2018), que evidenciaram uma diminuição na viabilidade celular no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao modelo de DAE induzida por STZ, devido a significativa apoptose neuronal e fragmentação do DNA induzida pelo STZ. Evidências histopatológicas também revelaram que a STZ causa perda neuronal específica (SAXENA *et al.*, 2010) por seus efeitos neurotóxicos no axônio e na mielina que causam desmielinização neuronal em algumas regiões cerebrais responsáveis pelo aprendizado e memória, incluindo o hipocampo e áreas periventriculares (WEINSTOCK; SHOHAM, 2004).

O tratamento com o ACG e cafeína foi capaz de aumentar significativamente o número de células viáveis no córtex pré-frontal e no hipocampo, inclusive nos animais controles que não receberam ICV-STZ. No estudo de Dalmagro e colaboradores (2022), foi investigado os efeitos neuroprotetores do ACG e seus principais metabólitos em culturas primárias de neurônios granulares cerebelares de ratos, foi observado grande efeito antioxidante do ACG (10 μ M) frente ao estresse nitrosativo induzido pelo doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (SNP), aumentando a viabilidade celular pelo ensaio MTT e diminuindo aspectos morfológicos semelhantes a de células apoptóticas.

Em estudos diferentes, foram observados efeitos benéficos do ACG em modelos de neurotoxicidade, Gao e colaboradores (2021) investigaram a citotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio em células SH-SY5Y e demonstraram que o ACG reduziu a taxa de

apoptose, aumentou a viabilidade celular e melhorou a morfologia celular, devido à sua capacidade antioxidante. Em outro estudo, Silva e colaboradores (2004) examinaram o efeito neuroprotetor de um extrato de *Hypericum perforatum* em um modelo da DA induzida pelo peptídeo A β em neurônios do hipocampo cultivados. O extrato, rico em compostos fenólicos do tipo ACG, resultou em diminuição dos efeitos tóxicos, incluindo alterações morfológicas associadas à apoptose e aumento da viabilidade celular. Além disso, Han e colaboradores (2010) realizaram um estudo utilizando uma linha celular de neuroblastoma humano e mostraram que o pré-tratamento com ACG preveniu a diminuição da viabilidade celular induzida pelas proteínas A β , resultando em uma superexpressão da enzima glicolítica fosfoglicerato quinase-1 e regulando a apoptose neuronal. Esses achados sugerem que o ACG possui propriedades neuroprotetoras e pode ser uma estratégia promissora no tratamento de distúrbios neurodegenerativos, como a DA.

Com relação a cafeína, o tratamento com cafeína 5 mg/kg demonstrou proteger o cérebro do camundongo neonatal contra a diminuição da atrofia cerebral e alterações na função motora após a indução de hipóxia-isquemia, demonstrando o efeito neuroprotetor da cafeína (WINERDAL *et al.*, 2017). Enquanto em estudos *in vitro* com culturas de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, foi observado que o tratamento com cafeína apresentou efeito benéfico. Quando expostas ao A β para induzir neurotoxicidade, as células tratadas com cafeína mostraram aumento na expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e redução na expressão da proteína pró-apoptótica BAX. Além disso, a cafeína inibiu o aumento da expressão de proteínas relacionadas à DA (APP e BACE-1), e reduziu o estresse oxidativo (reduzindo a atividade de NF- κ B, reduzindo a produção de ERO's, aumentando a atividade da superóxido dismutase (SOD) e diminuindo a concentração de MDA), em células expostas ao AlCl₃ e A β ₂₅₋₃₅ (GIUNTA *et al.*, 2014; KESHAVARZ *et al.*, 2017). Também foi evidenciado uma capacidade de neurogenese no hipocampo após o tratamento crônico com a cafeína, no estudo de Tiwari e colaboradores (2023) com modelo de DAE induzida por ICV-STZ em ratos. Essa capacidade de neurogenese foi relacionada com a melhora na avaliação cognitiva nos testes comportamentais.

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é essencial para a potenciação de longo-prazo, contribuindo para a plasticidade sináptica, aprendizado e memória (TAPIA-ARANCIBIA *et al.*, 2008) e juntamente com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), atua regulando a neurogênese no hipocampo, sendo também essencial para sobrevivência a vários insultos neuronais e promovem a regeneração neuronal após lesão (HAN *et al.*, 2013). Pesquisas investigam a relação do BDNF e de variáveis metabólicas com

a DA, demonstrando uma diminuição da expressão do BDNF no hipocampo e em regiões corticais temporal e frontal nos pacientes com DA (MURER; YAN; RAISMAN-VOZARI, 2001; TAPIA-ARANCIBIA *et al.*, 2008; GAMBA *et al.*, 2019). Sendo essa diminuição de BDNF também relacionada à diminuição da atividade de CREB, bem como ao acúmulo de A β , hiperfosforilação da Tau, neuroinflamação e apoptose neuronal (TEJEDA; DÍAZ-GUERRA, 2017).

É amplamente conhecido que a potenciação a longo prazo (LTP) e a plasticidade sináptica desempenham um papel crucial na aprendizagem e na memória, e quando esses processos são interrompidos, ocorrem déficits cognitivos. A infusão ICV-STZ tem sido utilizada como um modelo experimental para induzir a interrupção da plasticidade sináptica (XU *et al.*, 2014). A regeneração de axônios tem sido considerada como uma estratégia terapêutica promissora para doenças neurodegenerativas (CHEN *et al.*, 2009). A sinaptofisina desempenha um papel importante na regulação da sinaptogênese e na função sináptica, promovendo o aumento no número e densidade das sinapses neuronais (DAS *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2014). Pacientes com DA apresentam níveis reduzidos de sinaptofisina no hipocampo, o que pode estar relacionado ao declínio cognitivo observado nesses pacientes (PERDAHL *et al.*, 1984; DEKOSKY; SCHEFF, 1990). Estudos também indicam uma diminuição significativa na densidade sináptica em áreas cerebrais envolvidas na aprendizagem e memória na demência (STEPHEN; DOUGLAS, 2003).

Na avaliação do fator de crescimento celular através da imunomarcagem com o BDNF, foi evidenciada uma diminuição do fator de crescimento celular no córtex pré-frontal e hipocampo de animais submetidos a ICV-STZ. Corroborando com nossos resultados, estudos conduzidos por Tiwari e colaboradores (2021) demonstraram que a redução da expressão de BDNF no córtex e no hipocampo está associada ao prejuízo na aprendizagem espacial e na memória de retenção, no modelo de DA induzida por ICV-STZ. Esses resultados são consistentes com outros estudos que também observaram uma diminuição na expressão de BDNF no córtex e no hipocampo no modelo de DA induzida por ICV-STZ (STEVES *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2021; AGRAWAL *et al.*, 2020).

O tratamento com o ACG e cafeína foi capaz de aumentar significativamente o fator de crescimento celular no córtex pré-frontal e hipocampo em comparação com o grupo de animais submetidos a ICV-STZ. Os polifenóis são objeto de estudo devido ao seu efeito na proliferação e diferenciação das células do hipocampo, além disso, são importantes nas dietas porque combatem os radicais livres, reduzem a inflamação e são capazes de reduzir a hiperfosforilação de tau (DIAS *et al.*, 2012; ROMÁN *et al.*, 2019).

O efeito neuroprotetor do ACG é atribuído principalmente à sua atividade antioxidante, embora também esteja envolvido em outros mecanismos. De fato, tanto o ACG quanto seu metabólito, ácido m-cumárico, promovem o crescimento de neuritos hipocampais, estimulando diretamente os nervos cerebrais, apoiando a neuroplasticidade e ativando o receptor de benzodiazepínico, do Ácido Gama Aminobutiírico (GABA) (ITO *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2012). Em um estudo conduzido por Amato e colaboradores (2019), constatou-se que o ACG possui propriedades inibitórias do estresse oxidativo e nitrosativo, reduzem a expressão e atividade de agentes inflamatórios, resultando em menor neuroinflamação e ativação glial, redução de apoptose, aumento de BDNF e inibição da AchE.

Vários estudos anteriores, como os realizados por Costa e colaboradores (2008a, 2008b), comprovaram que o tratamento agudo com cafeína melhora a memória de reconhecimento e previne o declínio cognitivo associado à idade nesse tipo de memória, ao aumentar a expressão de BDNF e TrkB em camundongos. Além disso, Sallaberry e colaboradores (2013) também demonstraram que o tratamento com cafeína reduz substancialmente os prejuízos relacionados à idade na memória de evitação inibitória, concomitantemente elevando os níveis de BDNF no hipocampo.

Estudos em animais identificaram que a cafeína e o bloqueio seletivo dos alvos moleculares da cafeína – receptores A2A de adenosina (YU *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2019) fornecem uma proteção robusta contra disfunção do humor e da memória em modelos animais de doença cerebral (CUNHA, 2016). Esses efeitos protetores da cafeína contra a disfunção cerebral têm sido associados à capacidade da cafeína e dos antagonistas dos receptores A2A de ajustar a função das sinapses, ou seja, controlar a plasticidade sináptica e prevenir a sinaptotoxicidade (KASTER, 2015; CANAS *et al.*, 2018; GONÇALVES *et al.*, 2019) um processo que está no centro do início de depressão e disfunção relacionada à memória, DA (DUMAN, 2012; SELKOE, 2002). Podemos enfatizar que a sinaptotoxicidade é reduzida pela cafeína em diferentes modelos experimentais como episódio convulsivo (COGNATO *et al.*, 2010), modelo de doença de ataxia espinocerebelar tipo 3 que causa degeneração do sistema nervoso (GONÇALVES *et al.*, 2017, 2013) e induzida por STZ no DM (DUARTE *et al.*, 2012). Dessa forma, esses estudos demonstram que o consumo de cafeína pode ser útil na prevenção de déficits cognitivos em doenças neurodegenerativas.

Estudos *in vivo* também revelaram que a cafeína aumenta significativamente a expressão de BDNF no hipocampo e de seu principal receptor, TrkB, no cérebro. Tais estudos foram conduzidos em camundongos com modelo transgênico duplo de DA PS1/APP (HAN *et al.*, 2013) e em camundongos submetidos a uma dieta rica em gordura (MOY *et al.*, 2013).

Esses estudos demonstraram uma redução no comprometimento da memória, sugerindo que esse aumento na expressão de BDNF-TrkB pode ser um mecanismo chave na compreensão do efeito neuroprotetor da cafeína na DA. Corroborando com outros achados em que o tratamento crônico com cafeína aumenta a expressão de BDNF-TrkB no hipocampo, promovendo a reversão do comprometimento da memória (COSTA *et al.*, 2008; GHONEIM *et al.*, 2015).

A inflamação desempenha um papel fundamental na progressão da DA, como mostrado em vários estudos, nos quais pacientes com DA apresentam características inflamatórias no cérebro, incluindo níveis elevados de citocinas e marcadores de gliose nas áreas afetadas pela doença (PERRY *et al.*, 2010; AGUZZI *et al.*, 2013). A neuroinflamação ocorre precocemente na progressão da DA, antes mesmo da formação de placas e emaranhados (ZILKA *et al.*, 2006; KAMAT *et al.*, 2012). A ativação das células gliais está intimamente relacionada à neuroinflamação e desempenha um papel significativo na patogênese da DA, começando nos estágios iniciais de comprometimento cognitivo leve e atingindo o pico em casos moderadamente afetados (ARENDS *et al.*, 2000; MRAK; GRIFFIN, 2001; IFUKU *et al.*, 2012).

A micróglia, como a principal célula imune do cérebro, apresenta atividade e proliferação aumentadas com o envelhecimento no neocórtex, incluindo o hipocampo e o córtex entorrinal, em indivíduos saudáveis. No entanto, em cérebros com DA, observa-se uma maior ativação e proliferação da micróglia, em paralelo com a presença de placas de A β , principalmente no hipocampo (EKONOMOU *et al.*, 2015). Além disso, a astrogliose, caracterizada pelo aumento da expressão de GFAP, hipertrofia do corpo celular e dos processos celulares, juntamente com as falhas cognitivas, tem sido associada ao envelhecimento normal e, de forma mais significativa, à DA (DOSSI *et al.*, 2018).

Na avaliação da ativação de astrócitos (astrogliose) através da imunomarcagem com o GFAP, foi evidenciada um aumento da ativação de astrócitos no córtex pré-frontal e hipocampo de animais submetidos a ICV-STZ. Nossos dados corroboram com os achados anteriores, que relataram que a administração de ICV-STZ causa um aumento significativo na neuroinflamação do cérebro de ratos, aumentando a liberação de citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α , aumentando os níveis de MDA e expressão da proteína de GFAP, diminuindo os níveis de GSH, além de gerar radicais livres no córtex e hipocampo, contribuindo para os processos neurodegenerativos (KAMAT *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2008; RAI *et al.*, 2014). O aumento da expressão de astrócitos nas regiões do hipocampo está relacionado ao aumento de estresse oxidativo e ao declínio cognitivos nos testes de memória de trabalho, de

reconhecimento e espacial, além disso, uma disregulação na sinalização de insulina, em camundongos após a ICV-STZ (ROSTAMI *et al.*, 2017). Estudos usando o modelo ICV-STZ também demonstraram que a ativação de caspases e o aumento da expressão de GFAP em astrócitos ativados está associado à redução da função sináptica, o que sugere que a função alterada do hipocampo pode resultar em comprometimento da memória (FINCH *et al.*, 2003; ROSTAMI *et al.*, 2017; RAJASEKAR *et al.*, 2014).

É importante ressaltar que a neuroinflamação desencadeada pela injeção de ICV-STZ também pode ser atribuída à disfunção da via IRS/PI3K/AKT/GSK-3 β . Diversas pesquisas associaram a inflamação cerebral à desregulação dessa via de sinalização (GERZSON *et al.*, 2020; AGRAWAL *et al.*, 2020; HUANG *et al.*, 2022). Estudos demonstraram que um dos principais resultados bioquímicos do modelo de DAE induzido por ICV-STZ é a inibição da sinalização da via IRS/PI3K/AKT, o que leva a uma desregulação da GSK-3 β , resultando em seu aumento de atividade. Esse processo contribui para a acumulação de A β e a hiperfosforilação de Tau, resultando em um aumento da neuroinflamação e diminuição da viabilidade neuronal (KAMAT *et al.*, 2015).

O tratamento com o ACG e cafeína foi capaz de diminuir significativamente a ativação de astrócitos no córtex pré-frontal e hipocampo em comparação com o grupo de animais submetidos as injeções de ICV-STZ. Corroborando com nossos dados, o estudo realizado por SHAH e colaboradores (2022), mostrou que o tratamento com o ACG foi capaz de diminuir a expressão de GFAP no córtex de camundongos, no modelo de isquemia cerebral focal permanente. Somando-se a isso, os resultados obtidos por Lee e colaboradores (2020) em estudos utilizando o modelo de isquemia transitória demonstraram que o pré-tratamento com ACG apresentou efeitos neuroprotetores, prevenindo o declínio cognitivo induzido pela isquemia e reduzindo o dano neuronal no hipocampo. Esses efeitos foram atribuídos às propriedades anti-inflamatórias do ACG, que resultaram no aumento das citocinas anti-inflamatórias, como as interleucinas IL-4 e IL-13, e na diminuição do fator de necrose tumoral α (TNF- α). Além disso, o ACG está relacionado com a eliminação de radicais livres, modulação do metabolismo da glicose e lipídios, regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL -6), IL-1 β e interferon-gama (IFN- γ), regulação positiva do fator nuclear 2 relacionado ao eritróide 2 (Nrf-2) que é importante na manutenção da glicemia e reposta anti-inflamatória, e inibição da atividade do fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2), além de regular negativamente a expressão do receptor Toll-like 4

(TLR4), desempenhando assim um papel anti-inflamatório (CHEN, *et al.*, 2021; SINGH *et al.*, 2023).

Ontawong e colaboradores (2023) com a polpa de café, um subproduto do café, sendo os principais o ACG e cafeína, foi feito com uma linhagem celular RAW264.7. Neste estudo, foram estudados os marcadores inflamatórios e seu mecanismo. O tratamento com a polpa de café, suprimiu a síntese de citocinas e mediadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), IL-1 β , ciclooxigenase-2 (COX-2), sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) e óxido nítrico (NO), bem como prostaglandina E2 (PGE2). Evidenciando o papel antiinflamatório dos compostos presentes na polpa de café, ACG e cafeína (ONTAWONG *et al.*, 2023).

De acordo com o estudo realizado por Ghoneim colaboradores (2015) em um modelo animal de DA induzido por cloreto de alumínio (AlCl₃), foi observado que o tratamento com cafeína na dose de 1,5 mg/kg apresentou efeito neuroprotetor, resultando em uma melhoria na expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e uma redução na marcação para GFAP no hipocampo, sugerindo que a Cafeína também poderia interferir na proteína ácida fibrilar glial (GFAP).

A cafeína e a adenosina possuem estruturas básicas muito semelhantes, pois ambas possuem esqueletos de purina. Isso permite que a cafeína se ligue aos receptores de adenosina como um antagonista competitivo da adenosina. Os receptores de adenosina, como A1R, A2AR, A2BR e A3R, são receptores acoplados à proteína G expressos em diferentes tipos de células, incluindo astrócitos e micróglia (STEFANELLO *et al.*, 2019). As células gliais desempenham um papel crucial no funcionamento das sinapses e os astrócitos têm sido associados à regulação dos níveis de adenosina nas fendas sinápticas (HALASSA *et al.*, 2007). Assim, a cafeína pode melhorar indiretamente a modulação das sinapses, possivelmente através da redução da neuroinflamação à modulação do receptor A2A, que também atua controlando a reatividade de astrócitos, micróglia e a neuroinflamação, o que pode levar a menos alterações sinápticas (SZCZECHOWIAK *et al.*, 2019; MADEIRA *et al.*, 2017).

Na avaliação da ativação das micróglia, microgliose, através da imunomarcagem com o Iba-1, foi observado um aumento da ativação das micróglia no córtex pré-frontal e hipocampo de animais submetidos a ICV-STZ. Corroborando com nossos resultados, Liu e colaboradores (2022) observaram um aumento no número de células positivas para Iba-1 e GFAP, juntamente com um aumento na expressão de proteínas de Iba-1 e GFAP no hipocampo de animais submetidos a ICV-STZ. Além disso, o estudo conduzido por Rai e

colaboradores (2014) também evidenciou um aumento na expressão proteica de CD11b, um marcador de micróglia em ratos, tanto no córtex quanto no hipocampo, indicando ativação glial e neuroinflamação. Esses achados sugerem que a ativação glial desempenha um papel fundamental no comprometimento da memória induzido por ICV-STZ e na morte neuronal.

O tratamento com o ACG e cafeína foi capaz de diminuir significativamente a ativação das micróglia no córtex pré-frontal e hipocampo em comparação com o grupo de animais submetidos a ICV-STZ. Concordando com nossos achados, vários estudos tem demonstrado que o ACG e cafeína presentes no café possuem potencial antioxidante e antiinflamatório (SANTANA-GÁLVEZ *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017). Shah e colaboradores (2022), mostrou que o tratamento com o ACG foi capaz de diminuir a expressão de Iba-1 no córtex de camundongos, no modelo de isquemia cerebral focal permanente.

Estudos demonstraram que o ACG pode exercer um efeito anti-inflamatório, inibindo a ativação de fatores inflamatórios como TNF- α e IL-6, e afetando o metabolismo de aminoácidos (FENG *et al.*, 2016). Além disso, pesquisas também apontaram que o ACG é capaz de reduzir os níveis do fator nuclear kappa B (NF- κ B p65) (GUO *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2015), contribuindo assim para seu efeito anti-inflamatório. A via NF- κ B está intimamente relacionada com a autoimunidade do corpo e desempenha um papel regulatório fundamental na secreção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão (RUIFENG *et al.*, 2014).

Também foi relatado que o tratamento com ACG em camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura e camundongos obesos diminuiu a expressão de genes marcadores de macrófagos no tecido adiposo, como Cd11c, Cd11b, Cd68 e F4/80 e genes mediadores pró-inflamatórios, como proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1) e TNF- α em macrófagos e diminuiu as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) geradas pela administração de uma dieta rica em gordura (VENDITTI *et al.*, 2015).

Existem evidências mostrando que o ACG pode estar envolvido na via de sinal da tirosina quinase/transdutor de sinal e ativador transcricional 3 e inibir a expressão da subunidade β do receptor de IL-6, transdutor de sinal de fosforilação da tirosina quinase 1 e ativador transcricional 3 sob estresse oxidativo. Também pode reverter a regulação da expressão e secreção de fatores inflamatórios (LOU *et al.*, 2016). Miao e colaboradores (2017), mostraram que o ACG tem um forte efeito no metabolismo do ácido araquidônico, inibindo a ativação de fatores inflamatórios como HIF-1 α , ICAM-1, VCAM-1, TNF- α , IL-6 e NF- κ B p65, protegendo assim a lesão de isquemia/reperfusão cerebral. Nos últimos anos, os cientistas descobriram que o ACG tem efeitos neuroprotetores com base em seus potentes

efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, e uma quantidade cada vez maior de provas demonstra que a suplementação de ACG é uma estratégia promissora para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como a DA (EN *et al.*, 2021; SINGH *et al.*, 2020; KUMAR, G, 2019; COLOMBO; PAPETTI, 2020).

O estudo de Othman e colaboradores (2022), mostrou o papel antiinflamatório e antiapoptótico da cafeína no modelo de Diabetes Melitos tipo 2 induzido em ratos alimentando-os com dieta rica em gordura e injetando uma única dose baixa de STZ por via intraperitoneal. Houve aumento da imunomarcção de CD11b nos ratos diabéticos e o pré-tratamento com cafeína resultou em melhora das alterações estruturais e diminuição dos níveis expressão de CD11b no hipocampo.

Um aumento dos níveis de cafeína no plasma foi relacionado a uma diminuição das citocinas inflamatórias no hipocampo, bem como a uma redução dos níveis de A β , tanto no plasma quanto no cérebro de camundongos transgênicos com DA (CAO *et al.*, 2009). Além disso, a administração crônica de cafeína em modelos animais de patologias semelhantes à DA demonstrou efeitos positivos, como a atenuação de marcadores de estresse oxidativo e pró-inflamatórios no hipocampo e a prevenção de déficits de memória espacial (LAURENT *et al.*, 2014). Outro estudo mostrou que a administração crônica de cafeína em um modelo animal com alterações relacionadas à idade, como comprometimento cognitivo, aumento de marcadores neuroinflamatórios e neurodegeneração, melhorou os déficits de memória, reduziu a expressão de ERO's e citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL-1 β , e exibiu efeitos antiapoptóticos (ULLAH *et al.*, 2015). A cafeína também possui atividade anti-inflamatória, reduzindo os níveis de marcadores pró-inflamatórios, como proteína C-reativa, interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-18, ao mesmo tempo em que aumenta os níveis de marcadores anti-inflamatórios, como IL-10 e adiponectina. Além disso, a cafeína atua como um inibidor competitivo não seletivo de fosfodiesterases (PDEs), enzimas responsáveis pela degradação do monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), resultando em um aumento da concentração de AMPC nas células (LONDZIN *et al.*, 2021).

Por fim, verificamos se as estruturas de ACG e cafeína seriam capazes de interagir com a estrutura da enzima AChE e com o IRS-1 através de modelagem molecular *in silico*, por meio do *docking molecular*. Foi possível observar que ambas as estruturas, tanto a estrutura do ACG quanto da cafeína, foram capazes de interagir com a estrutura da enzima AChE e com o IRS-1 de forma dinâmica através de fortes interações químicas, demonstrando uma possível inibição da AChE, permitindo que a ACh fique mais tempo atuando nas fendas pós-sinápticas, e modulação positiva do IRS-1.

Foi demonstrado que o ACG e a cafeína possuem grande potencial inibitório da AchE *in vivo*, além disso, foi observado que o efeito inibitório se dá de forma não competitiva ao sítio de ligação da AchE em um estudo *in silico* (KWON *et al.*, 2010; POHANKA; DOBES, 2013; FABIANI *et al.*, 2018; IŞIK; BEYDEMIR, 2021; ABD EL-AZIZ *et al.*, 2021). Na inibição não competitiva, os compostos reduzem a atividade catalítica da enzima ligando-se a uma área fora da região ativa da enzima, geralmente no sítio alostérico, enquanto na competição causa a redução da atividade catalítica ligando-se à região ativa da enzima (IŞIK; BEYDEMIR, 2021).

O potencial de inibição do ACG frente a AChE também já foi relatado nas áreas do córtex frontal e hipocampo no modelo de DA induzido por escopolamina (OBOH *et al.*, 2013; KWON *et al.*, 2010; NABAVI *et al.*, 2017; BOIANGIU *et al.*, 2020; BŁASZCZAK *et al.*, 2020) e em estudos *in silico* (WARDHANI *et al.*, 2019), também sendo observado que o composto ACG pode atuar como potente inibidor do alvo butirilcolinesterase (BChE) (SEONL *et al.*, 2011; ALI *et al.*, 2016; BUDRYN *et al.*, 2018).

Com relação ao potencial de inibição da cafeína frente a AChE foi mostrado no estudo *in silico* que a cafeína é um potencial inibidor da AChE (OKELLO *et al.*, 2012; POHANKA; DOBES, 2013; KUMAR *et al.*, 2019; BOIANGIU *et al.*, 2020; SHARMA *et al.*, 2022). Também foi evidenciado o efeito inibitório da cafeína frente a AchE em um ensaio *in vitro*, sendo mostrada uma inibição não competitiva (ABD EL-AZIZ *et al.*, 2021). Os triazóis à base de cafeína foram sintetizados e avaliados *in vitro* quanto às atividades inibitórias da enzima de clivagem 1 (BACE-1) da enzima precursora de amilóide β -site e da colinesterase, demonstrando um aumento da atividade de inibição da AchE e BACE-1 (SHARMA *et al.*, 2022).

O efeito inibitório sobre a AChE de compostos fenólicos depende fortemente da estrutura de um determinado composto, especialmente da posição e/ou número dos grupos C = O e OH (SZWAJGIER, 2013). Estudos sugerem que a densidade eletrônica e a energia de ligação são fatores importantes que contribuem para a bioatividade desses compostos fenólicos (IŞIK; BEYDEMIR, 2021). Com isso, em nosso estudo, acreditamos que a atividade inibitória do ACG frente a AChE pode ser devido à grande quantidade de grupos funcionais de OH presentes em sua estrutura, aumentando a sua capacidade em formar ligações no sítio alostérico da enzima, e que, possivelmente, o ACG atue de forma mais inibitória que a cafeína, devido a um número maior de ligações com a AchE. Uma melhora na transmissão do sistema colinérgico também foi revelada no estudo *in silico*, onde um constituinte do café e do chá verde – EGCG inibiu a AChE e a BChE (ALI *et al.*, 2016).

Outros estudos *in silico* também indicaram que a cafeína pode ser útil como agente anti-amiloidogênico na prevenção da DA (GUPTA; DASMAHAPATRA, 2019). Nesse estudo, a cafeína é apresentada como potencial molécula que desestabiliza os protofilamentos A β pré-formados. As simulações e cálculos de dinâmica molecular indicaram que o mecanismo de ação da cafeína pode estar associado ao rompimento das pontes de hidrogênio intercadeias e à desorganização da conformação da estrutura secundária de A β , por interferência na interação hidrofóbica entre os peptídeos A β 16-22 (SHARMA; PAUL, 2016; GUPTA; DASMAHAPATRA, 2019).

Com relação as interações realizadas pelo ACG e o IRS-1, foi evidenciado por Roy e colaboradores (2020) interações de ligação de hidrogênio com a proteína alvo do receptor de insulina. Além disso, um ensaio de glicose mostrou que compostos fenólicos, dentre eles o ACG, podem regular o metabolismo da glicose ao direcionar imediatamente AKT na linha celular HepG2 resistente à insulina. Além disso, os resultados da expressão de proteínas para IRS-1, Akt, PI3K e GLUT-4 mostraram regulação positiva significativa no caso de amostras tratadas com compostos fenólicos em comparação com o controle de resistência à insulina (CHEN *et al.*, 2019).

Foi evidenciado que o ACG e a cafeína promoveram significativamente o consumo de glicose em células 3T3-L1 resistentes à insulina induzidas por dexametasona, o que se deve, possivelmente, a uma melhora na resistência à insulina em adipócitos, regulando positivamente a expressão gênica do substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1), PI3K, AKT e transportador de glicose 4 (GLUT4) (WU *et al.*, 2023). A ingestão de cafeína também foi capaz de atenuar a resistência à insulina em um modelo animal de obesidade, diminuindo os níveis de glicose plasmática durante um teste de tolerância à insulina e aumentando a fosforilação da tirosina do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1), complexo p85/IRS-1 e pAkt/PKB (proteína quinase B) (JIA *et al.*, 2014).

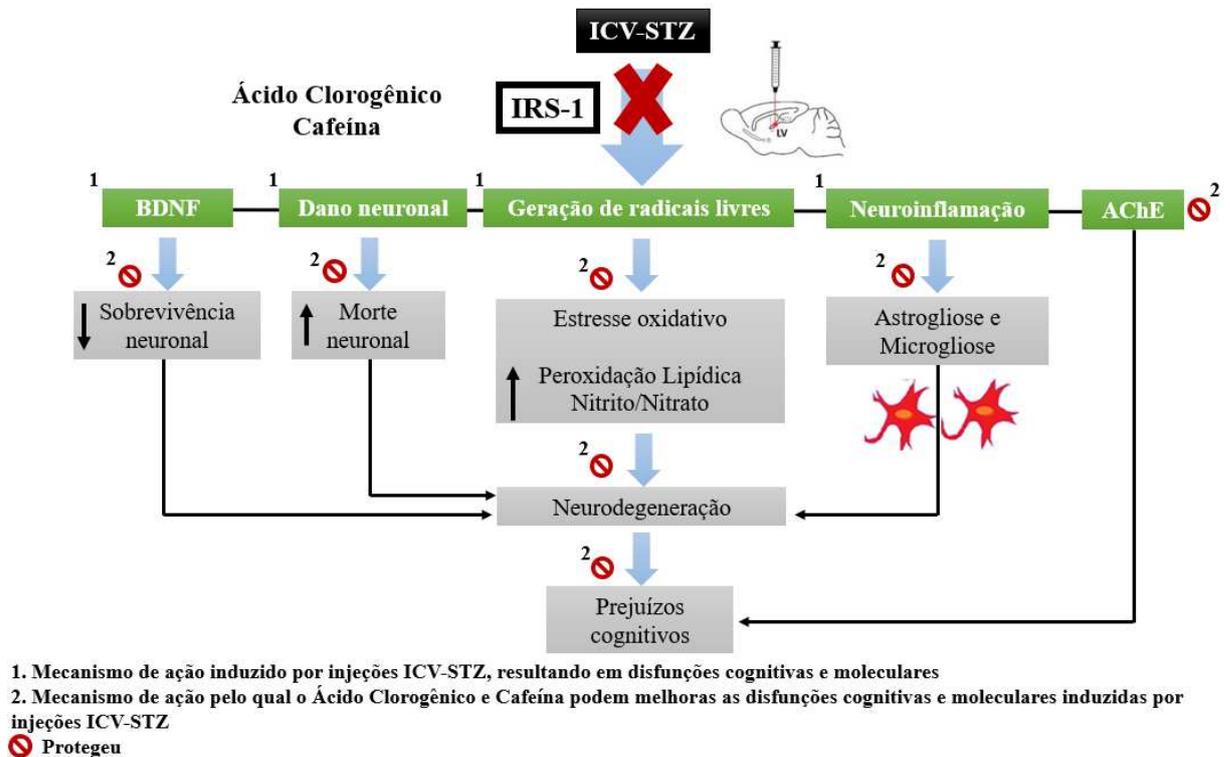
O desenvolvimento de inibidores alternativos da AChE, que também possuem propriedades antioxidantes, pode eliminar a deficiência de ACh e a formação de radicais livres na DA, demonstrando a importância de conhecer o efeito de inibição e o mecanismo de ligação dos compostos fenólicos nesta enzima pode ser clinicamente importante no tratamento de doenças neurodegenerativas (IŞIK; BEYDEMIR, 2021). Além disso, esses dados reforçam a ideia de que os compostos ACG e cafeína possam se ligar e estimular o IRS-1, reduzindo a resistência à insulina, e, dessa forma, poderiam estar modulando positivamente a via IRS-1/PI3K/Akt. Como resultado da modulação dessa via, podemos relacionar a uma maior

preservação das estruturas dos neurônios, devido a diminuição de agregação do peptídeo A β , de fatores oxidativos e inflamatórios, culminando em uma maior sobrevivência neuronal.

Em resumo, os resultados obtidos no presente estudo mostraram que as injeções ICV-STZ resultaram em déficits de aprendizado e memória, aumento do estresse oxidativo, diminuição da integridade neuronal e do BDNF, desenvolvimento de astrogliose e microgliose. O efeito neuroprotetor do ACG e cafeína foi demonstrada na atenuação do estresse oxidativo, da astrogliose e microgliose, juntamente com um aumento na manutenção na integridade neuronal. Como consequência, foi observado uma melhora no aprendizado e na memória. Além de demonstrarem capacidade de interagir fortemente com a AChE e IRS-1, conforme observado nos estudos de *in silico*, alvos importantes na compreensão da DA. A Figura 48 mostram o resumo esquemático dos resultados do presente estudo.

Assim, o ACG e cafeína, presentes no café, são substâncias que podem ser testadas em humanos, pois possuem baixa toxicidade e fazem parte do cotidiano de muitas pessoas, tendo, muitas vezes, o consumo diário dessas substâncias presentes no café, sendo moléculas promissoras para a pesquisa translacional na DAE.

Figura 48 - Fluxograma com a relação dos achados do presente trabalho



9 CONCLUSÃO

O tratamento com o ACG e cafeína protegeu contra a neurotoxicidade induzida pelas injeções ICV-STZ no modelo de DAE.

Foi observado que o ACG e cafeína diminuíram os déficits na memória de reconhecimento, memória aversiva e na memória espacial e aumentou a viabilidade neuronal. Esse efeito neuroprotetor se deve a diminuição do estresse oxidativo, da neuroinflamação, e o aumento do BDNF.

No estudo *in silico*, foi demonstrado que o ACG e a cafeína interagem fortemente com a AChE e IRS-1, sugerindo que estes atuam na modulação da acetilcolina e insulina no cérebro.

Assim, os resultados mostram que o tratamento com o ACG e cafeína podem alterar várias vias relacionadas com as fases iniciais da DA, como prevenir a neuroinflamação, estresse oxidativo, melhorar a neurotransmissão colinérgica, além de reduzir os déficits de memória, podendo ser uma estratégia terapêutica adjuvante e promissora para o tratamento da DAE.

10 LIMITAÇÕES DA PESQUISA

Devido às limitações impostas pela pandemia do COVID-19, não tivemos a oportunidade de investigar a via de sinalização IR/IRS/PI3K/Akt/GSK-3 β , nem testamos se houve acumulação do peptídeo A β e hiperfosforilação de Tau. A coloração com tioflavina S foi realizada anteriormente no meu projeto de mestrado para examinar o desenvolvimento de placas A β no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo DAE induzido por ICV-STZ; no entanto, nenhuma placa A β foi observada, provavelmente devido à menor duração da indução do modelo.

Com isso, no futuro, seria interessante verificar as lacunas que precisam ser preenchidas para uma compreensão mais profunda dos benefícios neuroprotetores do ACG e da cafeína, bem como estabelecer os mecanismos de interação específicos entre o ACG, cafeína e receptor de insulina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABD EL-AZIZ, Nourhan M. *et al.* Antioxidant and anti-acetylcholinesterase potential of artichoke phenolic compounds. **Food Bioscience**, v. 41, p. 101006, 2021.
- ABDIPRAONTO, A.; WU, S.; STAYTE, S.; VISSEL, B. The role of neurogenesis in neurodegenerative diseases and its implications for therapeutic development. **CNS Neurol Disord Drug Targets**. Apr; 7(2):187-210, 2008. PubMed PMID: 18537646. Epub 2008/06/10. eng.
- ABORODE, Abdullahi Tunde *et al.* Targeting oxidative stress mechanisms to treat Alzheimer's and Parkinson's disease: a critical review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, 2022.
- ABREU, Renata Viana *et al.* Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. **Pharmacology biochemistry and behavior**, v. 99, n. 4, p. 659-664, 2011.
- ADAMS, J. Paige; SWEATT, J. David. Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 42, n. 1, p. 135-163, 2002.
- AGRAWAL, I.; JHA, S. Mitochondrial Dysfunction and Alzheimer's Disease: Role of Microglia. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 12, 20 ago. 2020.
- AGRAWAL, R.; TYAGI, E.; SHUKLA, R.; NATH, C. Insulin receptor signaling in rat hippocampus: a study in STZ (ICV) induced memory deficit model. **Eur. Neuropsychopharmacol.** 21, 261 e 273, 2011.
- AGRAWAL, Rahul *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, 2010.
- AGUZZI, A.; BARRES, B. A.; BENNETT, M. L. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? **Science**; 339:156-61, 2013.
- AHMED, Samrah *et al.* Lateral parietal contributions to memory impairment in posterior cortical atrophy. **NeuroImage: Clinical**, v. 20, p. 252-259, 2018.
- AKIYAMA, Haruhiko *et al.* Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 21, n. 3, p. 383-421, 2000.
- 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.
- ALI, Babar *et al.* In silico analysis of green tea polyphenols as inhibitors of AChE and BChE enzymes in Alzheimer's disease treatment. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)**, v. 15, n. 5, p. 624-628, 2016.

ALI, Babar *et al.* In silico analysis of green tea polyphenols as inhibitors of AChE and BChE enzymes in Alzheimer's disease treatment. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)**, v. 15, n. 5, p. 624-628, 2016.

ALIEV, G.; LI, Y.; PALACIOS, H. H.; OBREONVICH, M. E. "Oxidative stress induced mitochondrial DNA deletion as a hallmark for the drug development in the context of the cerebrovascular diseases." *Recent. Pat. Cardiovasc. Drug. Discov.*, v. 6, p. 222-241, 2011.

ALIEV, G.; OBREONVICH, M. E.; TABREZ, S.; JABIR, N. R.; REDDY, V. P.; LI, Y.; BURNSTOCK, G.; CACABELOS, R.; KAMAL, M. A. Link between Cancer and Alzheimer Disease via Oxidative Stress Induced by Nitric Oxide- Dependent Mitochondrial DNA Over proliferation and Deletion. **Oxid. Med. Cell. Longev.** doi: 10.1155/962984, 2013.

ALIKHANI, N., GUO, L., YAN, S., DU, H., PINHO, C.M., CHEN, J.X., GLASER, E., YAN, S.S. Decreased proteolytic activity of the mitochondrial amyloid- β degrading enzyme, PreP peptidasome, in Alzheimer's disease brain mitochondria. **J. Alzheimers Dis.** 27, 75-87, 2011.

ALKON, D.L; EPSTEIN, H; KUZIRIAN, A; BENNETT, M.C; NELSON, T.J. Protein synthesis required for long-term memory is induced by PKC activation on days before associative learning. **Proc Natl Acad Sci**, v.102, p.16432-16437, 2005.

ALLARD, S.; LEON, W. C.; PAKAVATHKUMAR, P.; BRUON, M. A.; RIBEIRO-DA-SILVA, A.; CUELLO, A. C. "Impact of the NGF maturation and degradation pathway on the cortical cholinergic system phenotype." **J. Neurosci.** v. 32, p. 2002-2012, 2012.

ALMEIDA, Cláudia G. *et al.* Adenosine promotes neuronal recovery from reactive oxygen species induced lesion in rat hippocampal slices. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 2, p. 127-130, 2003.

ALUISE, C. D.; SOWELL, R. A.; BUTTERFIELD, D. A. Peptides and proteins in plasma and cerebrospinal fluid as biomarkers for the prediction, diagnosis, and monitoring of therapeutic efficacy of Alzheimer's disease. **Biochim Biophys Acta.**; 1782(10):549-58, oct, 2008.

ALVAREZ-BUYLLA, Arturo; LING, Chang-Ying; KIRN, John R. Cresyl violet: a red fluorescent Nissl stain. **Journal of neuroscience methods**, v. 33, n. 2-3, p. 129-133, 1990.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimers Dement**, v. 6, n. 2, p. 158-94, Mar, 2010.

AMATO, Antonella; TERZO, Simona; MULÈ, Flavia. Natural compounds as beneficial antioxidant agents in neurodegenerative disorders: A focus on Alzheimer's disease. **Antioxidants**, v. 8, n. 12, p. 608, 2019.

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

ANDRADE, V. M.; SANTOS, F. H.; BUEON, O. F. A. Neuropsicologia hoje. São Paulo, SP: **Artes Médicas**, 2004.

- ANDREI, C. C.; FERREIRA, D. T.; FACCIONE, M.; FARIA, T. J. “Da Química Medicinal à Química Combinatória e Modelagem Molecular: Um Curso Prático”, São Paulo: **Manole**, 2012.
- ANDRES-LACUEVA, C.; SHUKITT-HALE, B.; GALLI, R.L.; JAUREGUI, O.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M.; JOSEPH, J.A. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. **Nutr Neurosci.**, v. 8, p. 111-20, 2005.
- ANSARI, M. A.; SCHEFF, S.W. Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** v. 69, p. 155-67. 2010.
- ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive Processing**, v. 13, n. 2, p. 93– 110, 2012.
- AOYAMA, K. *et al.* Caffeine and uric acid mediate glutathione synthesis for neuroprotection. **Neuroscience**, v. 181, p. 206-215, 2011.
- APOSTOLATOS, André *et al.* Insulin promotes neuronal survival via the alternatively spliced protein kinase C δ II isoform. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 12, p. 9299-9310, 2012.
- 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.
- ARAÚJO, Sandra Regina Machado *et al.* Doença de Alzheimer no Brasil: uma análise epidemiológica entre 2013 e 2022. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 2, p. e29412240345-e29412240345, 2023.
- ARENDASH, G. W.; SCHLEIF, W.; REZAI-ZADEH K, JACKSON, E. K.; ZACHARIA, L. C.; CRACCHIOLO, J. R.; SHIPPY, D.; TAN, J. Caffeine protects Alzheimer’s mice against cognitive impairment and reduces brain β -amyloid production. **Neuroscience** 142, 941-952, 2006.
- ARENDASH, Gary W. *et al.* Caffeine reverses cognitive impairment and decreases brain amyloid- β levels in aged Alzheimer's disease mice. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 17, n. 3, p. 661-680, 2009.
- ARENDASH, Gary W.; CAO, Chuanhai. Caffeine and coffee as therapeutics against Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. s1, p. S117-S126, 2010.
- ARENDS, Y. M. *et al.* Micróglia, amyloid and dementia in Alzheimer disease. **Neurobiology of Aging**, v. 21, n. 1, p. 39–47, jan. 2000.
- ARENDDT, T. Synaptic degeneration in alzheimer’s disease. **Acta Neuropathol**, v. 118, p. 167–179, 2009.
- 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.
- ASCHERIO, Alberto *et al.* Coffee consumption, gender, and Parkinson’s disease mortality in the cancer prevention study II cohort: the modifying effects of estrogen. **American journal of epidemiology**, v. 160, n. 10, p. 977-984, 2004.

- ASCHERIO, Alberto *et al.* Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. **Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society**, v. 50, n. 1, p. 56-63, 2001.
- ATTWELL, D.; IADECOLA, C. The neural basis of functional brain imaging signals. **Trends Neurosci**, v. 25, n. 12, p. 621-5, Dec 2002.
- AWASTHI, Himani *et al.* Protective effect of curcumin against intracerebral streptozotocin induced impairment in memory and cerebral blood flow. **Life sciences**, v. 86, n. 3-4, p. 87-94, 2010.
- BADDELEY; A. EYSENCK, M. A., M. Memória. Porto Alegre: **Artmed**, 2011.
- BAGDAS, Deniz *et al.* Antinociceptive effect of chlorogenic acid in rats with painful diabetic neuropathy. **Journal of medicinal food**, v. 17, n. 6, p. 730-732, 2014.
- BAI, Renren *et al.* Oxidative stress: The core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease. **Ageing Research Reviews**, p. 101619, 2022.
- BAIRAM, Aida *et al.* Neonatal caffeine treatment does not induce long-term consequences on TrkB receptors or BDNF expression in chemosensory organs of adult rats. **Neuroscience letters**, v. 468, n. 3, p. 292-296, 2010.
- 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.
- BARANELLO, R. J.; BHARANI, K. L.; PADMARAJU, V.; CHOPRA, N.; LAHIRI, D. K.; GREIG, N. H.; *et al.* Amyloid-beta protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's Disease. **Curr Alzheimer Res**; 12:32-46, 2015.
- BARANOWSKI, Bradley J. *et al.* Healthy brain, healthy life: a review of diet and exercise interventions to promote brain health and reduce Alzheimer's disease risk. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 45, n. 10, p. 1055-1065, 2020.
- BARCA, Giuseppe 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, 2020.
- BASSANI, T. B.; TURNES, J. M.; MOURA, E. L. R.; BONATO, J. M.; CÓPPOLA-SEGOVIA, V.; ZANATA, S. M., ... VITAL, M. A. B. F. 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**, 335(July), 41–54, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.08.014>
- BASSOLI, B. *et al.* Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycaemia. **Cell Biochemistry and Function**. v. 26, p. 320-328, 2008.
- BAYDAS, G. *et al.* Melatonin reduces glial reactivity in the hippocampus, cortex, and cerebellum of streptozotocin-induced diabetic rats. **Free. Radic. Biol. Med.**, v. 35, p. 797-804, 2003.

BEACH, T. G.; MONSELL, S. E.; PHILLIPS, L. E.; KUKULL, W. Accuracy of the clinical diagnosis of Alzheimer disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 2005-2010. **J Neuropathol. Exp Neurol.**; 71(4):266-73, apr. 2012.

BEKINSCHTEIN, Pedro *et al.* Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis-and BDNF-dependent phase in the hippocampus. **Neuron**, v. 53, n. 2, p. 261-277, 2007.

BEKRIS, L. M.; YU, C. E.; BIRD, T. D. e TSUANG, D.W. Genetics of Alzheimer disease. **J Geriatr Psychiatry Neurol.**; 23: 213–227, 2010.

BENTLEY, C. *et al.* Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases. 2011.

BERLANGA-ACOSTA, Jorge *et al.* Insulin resistance at the crossroad of Alzheimer disease pathology: A review. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 560375, 2020.

BIASIBETTI, R.; ALMEIDA DOS SANTOS, J. P.; RODRIGUES, L.; WARTCHOW, K. M.; SUARDI, L. Z.; NARDIN, P, *et al.* Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer's disease are dependent on sex. **Behav Brain Res** 316:205–14, 2017.

BIBER, Knut; OWENS, Trevor; BODDEKE, Erik. What is microglia neurotoxicity (Not)? **Glia**, v. 62, n. 6, p. 841-854, 2014.

BIESSELS, G. J.; KAPPELLE, L. J. Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology?. **Bioch Society Transactions**, 33(5), 1041-1044, 2005.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, v. 1802, n. 11, p. 942-951, 2010.

BIOVIA, Dassault Systèmes. BIOVIA workbook, release 2017; BIOVIA pipeline pilot, release 2017. **San Diego: Dassault Systèmes**, 2020.

BISWAS, J.; GUPTA, S.; VERMA, D. K.; GUPTA, P.; SINGH, A.; TIWARI, S.;... SINGH, S. Involvement of glucose related energy crisis and endoplasmic reticulum stress: Insinuation of streptozotocin induced Alzheimer's like pathology. **Cellular Signalling**, 42(June 2017), 211–226, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.10.018>

BLANK, M., DORNELLES, A.S., WERENICZ, A., VELHO, L.A., PINTO, D.F., FEDI, A.C., SCHRODER, N., ROESLER, R.. Basolateral amygdala activity is required for enhancement of memory consolidation produced by histone deacetylase inhibition in the hippocampus. **Neurobiol. Learn. Mem.** 111, 1–8, 2014.

BLĄSZCZAK, W.; JEŻ, M.; SZWENGIEL, A. Polyphenols and inhibitory effects of crude and purified extracts from tomato varieties on the formation of advanced glycation end products and the activity of angiotensin-converting and acetylcholinesterase enzymes. **Food chemistry**, v. 314, p. 126181, 2020.

BLENONW, K.; DE LEON, M. J.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. **Lancet** 368, 387-403, 2006.

- BLESA, R. Noncognitive symptoms and long-term treatment expectations for Alzheimer disease. **Alzheimer Dis Assoc Disord**, v. 18 Suppl 1, p. S9-16, Apr-Jun, 2004. ISSN 0893-0341 (Print) 0893-0341.
- BLISS, T. V. P.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation. **Nature**. v. 361, p. 31-39, 1993.
- BLOKLAND, A.; JOLLES, J. Behavioral and biochemical effects of an ICV injection of streptozotocin in old Lewis rats. **Pharmacol Biochem Behav**. 47:833–837, 1994.
- BOIANGIU, Razvan Stefan *et al.* Cognitive facilitation and antioxidant effects of an essential oil mix on scopolamine-induced amnesia in rats: Molecular modeling of *in vitro* and *in vivo* approaches. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1519, 2020.
- BOMASANG-LAYNO, Emily; BRONSTHER, Rachel. Diagnosis and Treatment of Alzheimer's Disease:: An Update. **Delaware Journal of Public Health**, v. 7, n. 4, p. 74, 2021.
- BORAH, Kasmika *et al.* Potential Therapeutic Agents on Alzheimer's Disease through Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation Study of Plant-Based Compounds. **Chemistry & Biodiversity**, v. 20, n. 1, p. e202200684, 2023.
- BOSCO, D.; FAVA, A.; PLASTION, M.; MONTALCINI, T.; PUJIA, A. Possible implications of insulin resistance and glucose metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis. **J Cell Mol Med** 15: 1807–1821, 2011.
- BOTTON, Paulo Henrique *et al.* Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. **Behavioural brain research**, v. 214, n. 2, p. 254-259, 2010.
- BOUAYED, J.; RAMMAL, H.; DICKO, A, *et al* Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. **J Neurol Sci**. 262:77-84, 2007.
- BREITNER, J. C. *et al.* Risk of dementia and AD with prior exposure to NSAIDs in an elderly community-based cohort. **Neurology**, v. 72, n. 22, p. 1899-905, Jun 2 2009. ISSN 0028-3878
- BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in the rat: I situational factors. **Brit. J. Psychol.**, v. 48, p. 1-12, 1957.
- BUDRYN, Grażyna *et al.* Evaluation of butyrylcholinesterase inhibitory activity by chlorogenic acids and coffee extracts assed in ITC and docking simulation models. **Food Research International**, v. 109, p. 268-277, 2018.
- BUTTERFIELD, D. A.; BADER LANGE, M. L., R. Involvements of the lipidperoxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. **Biochim. Biophys. Acta** 1801, 924–929, 2010.
- CAINI, Saverio *et al.* Coffee, tea and caffeine intake and the risk of non-melanoma skin cancer: a review of the literature and meta-analysis. **European journal of nutrition**, v. 56, p. 1-12, 2017.

SCHMUED, L. C.; HOPKINS, K. J. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. **Brain Res.**, v.874, p.123–130, 2000.

CANADY, Valerie A. FDA approves new treatment for Alzheimer's disease. **Mental Health Weekly**, v. 33, n. 3, p. 6-7, 2023.

CANAS, Paula M. *et al.* Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by β -amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 47, p. 14741-14751, 2009.

CANAS, Paula M. *et al.* Neuronal adenosine A2A receptors are critical mediators of neurodegeneration triggered by convulsions. **Eneuro**, v. 5, n. 6, 2018.

CAO, C.; CIRRITO, J. R.; LIN, X.; WANG, L.; VERGES, D. K.; DICKSON, A. *et al.* Caffeine suppresses amyloid-beta levels in plasma and brain of Alzheimer's disease transgenic mice. **J Alzheimers Dis.** 17:681-697, 2009.

CAO, Chuanhai *et al.* Caffeine synergizes with another coffee component to increase plasma GCSF: linkage to cognitive benefits in Alzheimer's mice. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 25, n. 2, p. 323-335, 2011.

CAPPELLETTI, Simone *et al.* Caffeine: cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug?. **Current neuropharmacology**, v. 13, n. 1, p. 71-88, 2015.

CARDOSO, Susana *et al.* Cortical and hippocampal mitochondria bioenergetics and oxidative status during hyperglycemia and/or insulin-induced hypoglycemia. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 11, p. 942-951, 2010.

CAROLA, Valeria *et al.* Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behavioural brain research**, v. 134, n. 1-2, p. 49-57, 2002.

CASTRO, Diego M. *et al.* The economic cost of Alzheimer's disease: Family or public-health burden?. **Dementia & Neuropsychologia**, v. 4, p. 262-267, 2010.

CEREJEIRA, J.; LAGARTO, L.; MUKAETOVA-LADINSKA, E. B. Behavioral and psychological symptoms of dementia. **Front Neurol**, v. 3, p. 73, 2012. ISSN 1664-2295.

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.

CHAKRABARTI, S.; KHEMKA, V. K.; BANERJEE, A.; CHATTERJEE, G.; GANGULY, A.; BISWAS, A. Metabolic risk factors of sporadic Alzheimer's disease: implications in the pathology, pathogenesis and treatment. **Aging Dis**; 6:282-299, 2015.

CHAUHAN, V.; CHAUHAN, A. Oxidative stress in alzheimer's disease. **Pathophysiology**, v. 13, p. 195-208, 2006.

CHE, Baoquan *et al.* Distribution and accumulation of caffeine in rat tissues and its inhibition on semicarbazide-sensitive amine oxidase. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 5, p. 1248-1253, 2012.

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

CHEN, Jing *et al.* Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system. **Brain, behavior, and immunity**, v. 22, n. 3, p. 301-311, 2008.

CHEN, Lei; TENG, Hui; CAO, Hui. Chlorogenic acid and caffeic acid from *Sonchus oleraceus* Linn synergistically attenuate insulin resistance and modulate glucose uptake in HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 127, p. 182-187, 2019.

CHEN, Xing-Dong *et al.* Chlorogenic acid improves PTSD-like symptoms and associated mechanisms. **Current Neuropharmacology**, v. 19, n. 12, p. 2180, 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). **Mol Neurobiol**, v. 47, n. 2, p. 711-25, Apr 2013. ISSN 0893-7648

CHEN, Z. A.; WANG, J. L.; LIU, R. T.; REN, J. P.; WEN, L. Q.; CHEN, X. J.; *et al.* Liquiritin potentiate neurite outgrowth induced by nerve growth factor in PC12 cells. **Cytotechnology**. Jul; 60(1-3):125-32, 2009. PubMed PMID: 19789989. Pubmed Central PMCID: 2780551. Epub 2009/10/01. eng.

CHENG, Clara M. *et al.* Tau is hyperphosphorylated in the insulin-like growth factor-I null brain. **Endocrinology**, v. 146, n. 12, p. 5086-5091, 2005.

CHERBUIN, N.; SACHDEV, P.; ANSTEY, K. J. Higher normal fasting plasma glucose is associated with hippocampal atrophy: the PATH study. **Neurology** 79:1019–1026, 2012.

CHINNARAJA, D.; RAJALAKSHMI, R. Synthesis, spectral studies, *in vitro* and molecular docking studies of novel hydrazinyl carbothioamide derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 20, n. 4, p. 443-449, 2016.

CHIU, S. L.; CHEN, C. M.; CLINE, H. T. Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function in vivo. **Neuron**.; 58(5):708–719, 2008.

CHO, Eun Sun *et al.* Attenuation of oxidative neuronal cell death by coffee phenolic phytochemicals. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 661, n. 1-2, p. 18-24, 2009.

CITRON, M. Alzheimer's disease: treatments in discovery and development. **Nat Neurosci**, v. 5 Suppl, p. 1055-7, Nov 2002. ISSN 1097-6256 (Print) 1097-6256.

CLARK, Ian; LANDOLT, Hans Peter. Coffee, caffeine, and sleep: A systematic review of epidemiological studies and randomized controlled trials. **Sleep medicine reviews**, v. 31, p. 70-78, 2017.

CLEARY, J. P.; WALSH, D.M.; HOFMEISTER, J.J.; SHANKAR, G.M.; KUSKOWSKI, M.A.; SELKOE, D.J.; ASHE, K.H. Natural oligomers of the amyloid-b protein specifically disrupt cognitive function, **Nat. Neurosci.** 8, 79 e 84, 2005.

CLIFFORD, Michael N. *et al.* Hierarchical scheme for LC-MS n identification of chlorogenic acids. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2900-2911, 2003.

CODAGONNE, M.G.; PODESTÁ, M.F.; UCCELLI, N.A.; *et al.* Differential Local Connectivity and Neuroinflammation Profiles in the Medial Prefrontal Cortex and Hippocampus in the Valproic Acid Rat Model of Autism. **Dev Neurosci.** v. 37(3), p. 215-231, 2015.

COGNATO, G. P. *et al.* Nucleoside triphosphate diphosphohydrolases role in the pathophysiology of cognitive impairment induced by seizure in early age. **Neuroscience**, v. 180, p. 191-200, 2011.

COLOMBO, Raffaella; PAPETTI, Adele. An outlook on the role of decaffeinated coffee in neurodegenerative diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 5, p. 760-779, 2020.

CORNELIS, Marilyn C. *et al.* Targeted proteomic analysis of habitual coffee consumption. **Journal of internal medicine**, v. 283, n. 2, p. 200-211, 2018.

CORREIA, S. C. *et al.* Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria: Major players in Alzheimer's disease and diabetes interrelation. **Brain Research**, v. 1441, p. 64–78, 2012.

CORREIA, S. C. *et al.* Insulin-resistant brain state: The culprit in sporadic Alzheimer's disease? **Ageing Research Reviews**, v. 10, n. 2, p. 264–273, 2011.

COSTA, M. S.; BOTTON, P. H.; MIORANZZA, S.; SOUZA, D. O.; PORCIUNCULA, L.O. Caffeine prevents age-associated recognition memory decline and changes brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor (TrkB) content in mice. **Neuroscience**. 153:1071-1078, 2008.

COSTA, Marcelo S *et al.* "Caffeine improves adult mice performance in the object recognition task and increases BDNF and TrkB independent on phospho-CREB immunocontent in the hippocampus." **Neurochemistry international**, vol. 53,3-4, 2008. Doi: 89-94. doi:10.1016/j.neuint.2008.06.006

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

CRANE, P. K.; WALKER, R.; HUBBARD, R. A.; LI, G.; NATHAN, D. M.; ZHENG, H.; HANEUSE, S.; CRAFT, S.; MONTINE, T. J.; KAHN, S. E.; MCCORMICK, W.; MCCURRY, S. M.; BOWEN, J. D.; LARSON, E. B. Glucose levels and risk of dementia. **N Engl J Med** 369:540–548, 2013.

CROZIER, Alan; ASHIHARA, Hiroshi; TOMÁS-BARBÉLAN, Francisco (Ed.). **Teas, cocoa and coffee: plant secondary metabolites and health**. John Wiley & Sons, 2011.

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.

CUMMINGS, Jeffrey *et al.* Alzheimer's disease drug development pipeline: 2020. **Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions**, v. 6, n. 1, p. e12050, 2020.

CUNHA, G. M.; CANAS, P. M.; MELO, C. S.; HOCKEMEYER, J.; MÜLLER, C. E.; OLIVEIRA, C. R.; CUNHA, R. A. Adenosine A2A receptor blockade prevents memory dysfunction caused by betaamyloid peptides but not by scopolamine or MK-801. **Exp Neurol.**; 210(2):776-81, Apr, 2008.

CUNHA, Rodrigo A. How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration?. **Journal of neurochemistry**, v. 139, n. 6, p. 1019-1055, 2016.

CUNNANE, S. *et al.* Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. **Nutrition**, v. 27, n. 1, p. 3-20, Jan 2011. **Current aging science**, 4, pp. 118-127, 2011.

CUPION, T. L.; ZABEL, M. K. Alzheimer's silent partner: cerebral amyloid angiopathy. **Transl Stroke Res.** Nov 19, 2013.

CURTI, Valeria *et al.* Modulation of human miR-17-3p expression by methyl 3-O-methyl gallate as explanation of its in vivo protective activities. **Molecular nutrition & food research**, v. 58, n. 9, p. 1776-1784, 2014.

DAIBER, A.; DI LISA, F.; OELZE, M.; KRÖLLER-SCHÖN, S.; STEVEN, S.; SCHULZ, E.; MÜNDEL, T. Crosstalk of mitochondria with NADPH oxidase via reactive oxygen and nitrogen species signalling and its role for vascular function. **Br J Pharmacol**, 2015.

DALL'IGNA, Oscar P. *et al.* β -amyloid treatment sensitizes mice to amphetamine-induced locomotion but reduces response to caffeine. **Neurodegenerative Diseases**, v. 1, n. 1, p. 38-43, 2004.

DALL'IGNA, O.P.; FETT, P.; GOMES, M. W.; SOUZA, D. O.; CUNHA, R. A.; LARA, D. R. Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. **Exp Neurol.** 203:241-245, 2007.

DALMAGRO, Ana Paula *et al.* Antidepressant-like effect of caffeic acid: Involvement of the cellular signaling pathways. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, 2022.

DAVIGLUS, Martha L. *et al.* Risk factors and preventive interventions for Alzheimer disease: state of the science. **Archives of neurology**, v. 68, n. 9, p. 1185-1190, 2011.

De FELICE, F. G. Alzheimer's disease and insulin resistance: translating basic science into clinical applications. **J Clin Invest**, v. 123, n. 2, p. 531-9, Feb 2013.

De FELICE, F. G.; LOURENCO, M. V.; FERREIRA, S. T. How does brain insulin resistance develop in Alzheimer's disease? **Alzheimers Dement**, v. 10, n. 1 Suppl, p. S26-32, Feb 2014.

De La MONTE, S. M. Insulin resistance and Alzheimer's disease. **BMB Rep.** ;42(8):475-481, 2009.

De La MONTE, S. M. Type 3 diabetes is sporadic Alzheimer's disease: mini-review. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 24, n. 12, p. 1954-60, Dec 2014. ISSN 1873-7862. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25088942> >.

De ONBLE, V. J. *et al.* Vinpocetine: nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits of a step-through passive avoidance response in rats. **Pharmac. Biochem. Behav.**, v. 24: p. 1123-1128, 1986.

DEBNATH, Sujit Kumar *et al.* Drugs repurposing for SARS-CoV-2: new insight of COVID-19 druggability. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, n. just-accepted, 2022.

DEKOSKY, S. T.; SCHEFFS, W. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. **Ann Neurol** 27:457–464, 1990.
doi:10.1002/ana.410270502

DERRY, Christopher J.; DERRY, Sheena; MOORE, R. Andrew. Caffeine as an analgesic adjuvant for acute pain in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 12, 2014.

DESHMUKH, R. *et al.* Amelioration of intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive dysfunction and oxidative stress by vinpocetine -- a PDE1 inhibitor. **Eur J Pharmacol**, v. 620, n. 1-3, p. 49-56, Oct 12 2009. ISSN 0014-2999.

DETURE, Michael A.; DICKSON, Dennis W. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. **Molecular neurodegeneration**, v. 14, n. 1, p. 1-18, 2019.

DEVI, Kasi Pandima *et al.* Hesperidin: A promising anticancer agent from nature. **Industrial crops and products**, v. 76, p. 582-589, 2015.

DEWANJEE, Saikat *et al.* Altered glucose metabolism in Alzheimer's disease: Role of mitochondrial dysfunction and oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, 2022.

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.

DI FILIPPO, Massimiliano *et al.* Effects of central and peripheral inflammation on hippocampal synaptic plasticity. **Neurobiology of disease**, v. 52, p. 229-236, 2013.

DIAS, Gisele Pereira *et al.* "The role of dietary polyphenols on adult hippocampal neurogenesis: molecular mechanisms and behavioural effects on depression and anxiety." **Oxidative medicine and cellular longevity** vol. 2012 (2012): 541971.
doi:10.1155/2012/541971

DING, Ming *et al.* Caffeinated and decaffeinated coffee consumption and risk of type 2 diabetes: a systematic review and a dose-response meta-analysis. **Diabetes care**, v. 37, n. 2, p. 569-586, 2014.

DOS SANTOS, Michel David *et al.* Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biological and pharmaceutical bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2236-2240, 2006.

DOSSI, E.; VASILE, F.; ROUACH, N. Human astrocytes in the diseased brain. *Brain research bulletin*, 136, 139-156, 2018.

DRAPER, H. H.; HADELY, M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation, Meth. **Enzymol.** 186: 421-431, 1990.

DRINGEN, R.; SCHEIBER, I. F.; MERCER, J. F. Copper metabolism of astrocytes. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 0, n. MAR, p. 9, 2013.

DU, Fang *et al.* Mitochondrial oxidative stress contributes to the pathological aggregation and accumulation of tau oligomers in Alzheimer's disease. **Human Molecular Genetics**, v. 31, n. 15, p. 2498-2507, 2022.

DUARTE, João MN *et al.* Caffeine consumption attenuates neurochemical modifications in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of neurochemistry**, v. 111, n. 2, p. 368-379, 2009.

DUBEY, H.; GULATI, K.; & RAY, A. Amelioration by nitric oxide (ON) mimetics on neurobehavioral and biochemical changes in experimental model of Alzheimer's disease in rats. **NeuroToxicology**, 66, 58–65., 2018. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.03.001>

DUDAI, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? **Annu Rev Psychol**, v.55, p.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. **Int J Dev Neurosci**, v. 12, n. 8, p. 737-43, Dec 1994. ISSN 0736-5748. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7747600> >.

DUELLI, R.; KUSCHINSKY, W. Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. **News Physiol Sci**, v. 16, p. 71-6, Apr 2001.

DUMAN, Ronald S.; AGHAJANIAN, George K. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. **science**, v. 338, n. 6103, p. 68-72, 2012.

EHLERS, Anke *et al.* Risk assessment of energy drinks with focus on cardiovascular parameters and energy drink consumption in Europe. **Food and chemical toxicology**, v. 130, p. 109-121, 2019.

EILEEN DOLAN, M. Inhibition of DNA repair as a means of increasing the antitumor activity of DNA reactive agents. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 26, n. 2-3, p. 105-118, Jul 07 1997.

EKONOMOU, A. *et al.* Stage-specific changes in neurogenic and glial markers in Alzheimer's disease. **Biological psychiatry**, 77(8), 711-719, 2015.

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

ERICKSON, Kirk I.; MILLER, Destiny L.; ROECKLEIN, Kathryn A. The aging hippocampus: interactions between exercise, depression, and BDNF. **The Neuroscientist**, v. 18, n. 1, p. 82-97, 2012.

ERICSSON, K. A.; KINTSCH, W. Long-term working memory. **Psychol. Rev.**, v. 102, n. 2, p. 211, 1995.

ERK, SUSANNE, *et al.* Evidence of neuronal compensation during episodic memory in subjective memory impairment. **Archives of general psychiatry**, 68.8: 845-852, 2011.

- ERNFORS, Patrik *et al.* Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. **Neuron**, v. 5, n. 4, p. 511-526, 1990.
- ESKELINEN, Marjo H. *et al.* Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE study. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 16, n. 1, p. 85-91, 2009.
- ESMAILI, Zahra *et al.* Effects of sub-chronic caffeine ingestion on memory and the hippocampal Akt, GSK-3 β and ERK signaling in mice. **Brain Research Bulletin**, v. 170, p. 137-145, 2021.
- ESPINOSA, Janaina *et al.* Caffeine consumption prevents memory impairment, neuronal damage, and adenosine A_{2A} receptors upregulation in the hippocampus of a rat model of sporadic dementia. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 34, n. 2, p. 509-518, 2013.
- ESPIONSA, J.; ROCHA, A.; NUNES, F.; COSTA, M. S.; SCHEIN, V.; KAZLAUCKAS, V.; ESTEVES, Ingrid de Miranda. **Caracterização das alterações na via hipocampo-córtex pré-frontal medial em modelo farmacológico da doença de Alzheimer**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- FABIANI, Camila *et al.* A novel pharmacological activity of caffeine in the cholinergic system. **Neuropharmacology**, v. 135, p. 464-473, 2018.
- FAIYAZ *et al.* Nanomaterials in Alzheimer's disease treatment: a comprehensive review. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 26, n. 10, p. 851, 2021.
- FAN, Wenxuan *et al.* Online bioinformatics teaching practice: Comparison of popular docking programs using SARS-CoV-2 spike RBD-ACE2 complex as a benchmark. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 49, n. 6, p. 833-840, 2021.
- FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.18, n. 1, p. 23-36, 2006.
- FARHOOD, Hattf Bazool *et al.* Hepatoprotective effects of chlorogenic acid under hyperglycemic conditions. **Rom Biotechnol Lett**, v. 24, p. 301-307, 2019.
- 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.
- FELDMAN, R. S.; RYDER, W. S.; KUNG, J. T. Importance of nonvolatile compounds to the flavor of coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 733-739, 1969.
- FENG, Yan *et al.* Chlorogenic acid protects D-galactose-induced liver and kidney injury via antioxidation and anti-inflammation effects in mice. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 6, p. 1027-1034, 2016.
- FERNANDES, Mara Yone D. *et al.* Neuromodulation and neuroprotective effects of chlorogenic acids in excitatory synapses of mouse hippocampal slices. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2021.

- 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.
- FERRÉ, S. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. **J Neurochem**. 105:1067-1079, 2008.
- FERREIRA, D. A. S. Avaliação do efeito protetor do beta-cariofileno em modelos celulares de doenças neurodegenerativas, 57, 2014.
- FERRER, I. Altered mitochondria, energy metabolism, voltage-dependent anion channel, and lipid rafts converge to exhaust neurons in Alzheimer's disease. **J. Bioenerg. Biomembr.** 41, 425–431, 2009.
- FERRI, C. P.; JACOB, K. S. Dementia in low-income and middle-income countries: Different realities mandate tailored solutions. **PLoS medicine**, 14, 2017.
- FERRI, Cleusa P. *et al.* Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. **The lancet**, v. 366, n. 9503, p. 2112-2117, 2005.
- FILLIT, Howard; GREEN, Allan. Aducanumab and the FDA - where are we now?. **Nature Reviews Neurology**, v. 17, n. 3, p. 129-130, 2021.
- FINCH, Caleb E. Neurons, glia, and plasticity in normal brain aging. **Neurobiology of aging**, v. 24, p. S123-S127, 2003.
- FINEFROCK, A. E.; BUSH, A. I.; DORCISWAMY, P. M. Current status of Metals as Therapeutic Targets in Alzheimer's Disease. **J. AM. Geriatr. Soc.**, v. 51, p. 1143-1148, 2003.
- FISCHER, R.; MAIER, O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. **Oxid Med Cell Longev**; 610813, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/610813>.
- FORLENZA, Orestes Vicente *et al.* Lower cerebrospinal fluid concentration of brain-derived neurotrophic factor predicts progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. **Neuromolecular medicine**, v. 17, p. 326-332, 2015.
- FÖRSTL, Hans; KURZ, Alexander. Clinical features of Alzheimer's disease. **European archives of psychiatry and clinical neuroscience**, v. 249, p. 288-290, 1999.
- 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.
- FREDHOLM, Bertil B. *et al.* Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacological reviews**, v. 51, n. 1, p. 83-133, 1999.
- FREEDMAN, Neal D. *et al.* Association of coffee drinking with total and cause-specific mortality. **N Engl J Med**, v. 366, p. 1891-1904, 2012.
- 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; GREGORIO, S. P.; DIAS NETO, E.; OJOPI, E. P. B. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. **Rev. psiquiatr. Clín.**, v.31, n.1, p. 19-25, 2004.

FRISONI, Giovanni B. *et al.* The probabilistic model of Alzheimer disease: the amyloid hypothesis revised. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 53-66, 2022.

FROTA, N. A. F. *et al.*, Critérios para o Diagnóstico de Doença de Alzheimer. **Dementia e Neuropsychologia**, v. 5, n. 1, p. 5-10, 2011.

GAHR, M.; ONWAK, D. A.; CONNEMANN, B. J.; SCHÖNFELDT-LECUONA, C. Cerebral amyloid angiopathy— a disease with implications for neurology and psychiatry. **Brain Res.**26(1519):19–30, 2013.

GALIC, Michael A.; RIAZI, Kiarash; PITTMAN, Quentin J. Cytokines and brain excitability. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 33, n. 1, p. 116-125, 2012.

GAMBA, Paola *et al.* A crosstalk between brain cholesterol oxidation and glucose metabolism in Alzheimer's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, p. 556, 2019.

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, L., LI, X., MENG, S., MA, T., WAN, L., XU, S., Chlorogenic Acid Alleviates A β 25-35 -Induced Autophagy and Cognitive Impairment via the mTOR/TFEB Signaling Pathway. 2014 Mar;388(1-2):277-86. doi: 10.1007/s11010-013-1919-9. Epub 2013 Dec 27.

GAO, Lijuan *et al.* Chlorogenic acid alleviates A β 25-35-induced autophagy and cognitive impairment via the mTOR/TFEB signaling pathway. **Drug design, development and therapy**, p. 1705-1716, 2020.

GAO, Li-Juan *et al.* Chlorogenic acid enhances autophagy by upregulating lysosomal function to protect against SH-SY5Y cell injury induced by H₂O₂. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 21, n. 5, p. 1-10, 2021.

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.

GARCÍA, M.; MILLÁN, C.; BALMACEDA-AGUILERA, C.; CASTRO, T.; PASTOR, P.; MONTECIONS, H.; REINICKE, K.; ZÚÑIGA, F. *et al* Hypothalamic ependymal-glia cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. **J Neurochem** 86:709–724, 2003.

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.

GELBER, Rebecca P. *et al.* Coffee intake in midlife and risk of dementia and its neuropathologic correlates. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 23, n. 4, p. 607-615, 2011.

GELLA, A. AND DURANY, N. Oxidative stress in Alzheimer disease. **Cell Adh. Migr.**, v. 3, p. 88-93, 2009.

GEMELLI, T. E. A.; ANDRADE, R. B.; CASTRO, A. L.; GARCIA, L. P.; FUNCHAL, Cláudia. Estresse oxidativo como fator importante na fisiopatologia da Doença de Alzheimer. **Revista Uniara**, v.16, n.1, ju. 2013.

GENG, G.; LUO, H. M. The research progress of metals correlated to Alzheimer's disease. *Yao XueXueBao*, 2014.

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.

GHASEMI-KASMAN, M., SHOJAEI, A., GOL, M., MOGHADAMNIA, A. A., BAHARVAND, H., & JAVAN, M. miR-302/367-induced neurons reduce behavioral impairment in an experimental model of Alzheimer's disease. **Molecular and Cellular Neuroscience**, 86 (June 2017), 50–57, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.11.012>

GHONEIM, Fatma M. *et al.* Protective effect of chronic caffeine intake on gene expression of brain derived neurotrophic factor signaling and the immunoreactivity of glial fibrillary acidic protein and Ki-67 in Alzheimer's disease. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 7, p. 7710, 2015.

GIBBONS, G. S.; BANKS, R. A.; KIM, B.; CHANGOLKAR, L.; RIDDLE, D. M.; LEIGHT, S. N.; IRWIN, D. J.; TROJAONWSKI, J. Q.; LEE, V. M. Y. Detection of Alzheimer Disease (AD)-Specific Tau Pathology in AD and NonAD Tauopathies by Immunohistochemistry With Novel Conformation-Selective Tau Antibodies. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, 77, pp. 216-228, 2018.

GILBERT, B. J. The role of amyloid β in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **J Clin Pathol** 66:362–366, 2013.

GIUNTA, Salvatore; ANDRIOLO, Violetta; CASTORINA, Alessandro. Dual blockade of the A1 and A2A adenosine receptor prevents amyloid beta toxicity in neuroblastoma cells exposed to aluminum chloride. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 54, p. 122-136, 2014.

GLENNER, George G.; WONG, Caine W. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 122, n. 3, p. 1131-1135, 1984.

GODYŃ, Justyna *et al.* Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 1, p. 127-138, 2016.

GOEDERT, Michel; SPILLANTINI, Maria Grazia. A century of Alzheimer's disease. **science**, v. 314, n. 5800, p. 777-781, 2006.

GÖKCEN, Büşra Başar; ŞANLIER, Nevin. Coffee consumption and disease correlations. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 2, p. 336-348, 2019.

GOLD, P.E.; McGAUGH, J. L. A single-trace, two-processes view of memory storage processes. In: DEUTSCH, D.; DEUTSCH, J.A. (eds). Short-term memory. Academic Press, New York, p.355-378, 1975.

GOMAA, Adel A. *et al.* Advancing combination treatment with cilostazol and caffeine for Alzheimer's disease in high fat-high fructose-STZ induced model of amnesia. **European Journal of Pharmacology**, v. 921, p. 174873, 2022.

GONÇALVES, Francisco Q. *et al.* Synaptic and memory dysfunction in a β -amyloid model of early Alzheimer's disease depends on increased formation of ATP-derived extracellular adenosine. **Neurobiology of disease**, v. 132, p. 104570, 2019.

GONÇALVES, Nélio *et al.* Caffeine alleviates progressive motor deficits in a transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia. **Annals of neurology**, v. 81, n. 3, p. 407-418, 2017.

GONÇALVES, Nélio *et al.* Caffeine and adenosine A2A receptor inactivation decrease striatal neuropathology in a lentiviral-based model of Machado–Joseph disease. **Annals of neurology**, v. 73, n. 5, p. 655-666, 2013.

GONÇALVES, R. B. **Desenvolvimento e Validação de Novos Métodos de Distribuição da População Inicial em Algoritmos Genéticos Para o Problema de *Docking* Proteína-Ligante**. 2008. 130 p. Dissertação (Mestrado em Ciências em Modelagem Computacional) – Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis.

GODYŃ, Justyna *et al.* Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 1, p. 127-138, 2016.

GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, Raúl; GARCÍA-BARRERA, Tamara; GÓMEZ-ARIZA, José Luis. Combination of metabolomic and phospholipid-profiling approaches for the study of Alzheimer's disease. **Journal of proteomics**, v. 104, p. 37-47, 2014.

GOVINDARAJU, Thimmaiah (Ed.). *Alzheimer's Disease: Recent Findings in Pathophysiology, Diagnostic and Therapeutic Modalities*. 2022.

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.

GRAY, Nora E. *et al.* Caffeoylquinic acids in *Centella asiatica* protect against amyloid- β toxicity. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 40, n. 2, p. 359-373, 2014.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L, WISHONK J. S, TANNENBAUM S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N]nitrate in biological fluids. **Anal.Biochem.** 126: 131-138, 1982.

GREENFIELD, Jeffrey P. *et al.* Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer β -amyloid peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 2, p. 742-747, 1999.

GRIEB, P. Intracerebroventricular streptozotocin injections as a model of Alzheimer's disease: in search of a relevant mechanism. **Mol. Neurobiol.** 53, 1741–1752, 2016.

GROSSO, Giuseppe *et al.* Coffee, caffeine, and health outcomes: an umbrella review. **Annual review of nutrition**, v. 37, p. 131-156, 2017.

- GRÜNBLATT, E.; HOYER, S.; RIEDERER, P. Gene expression profile in streptozotocin rat model for sporadic Alzheimer's disease. **J. Neural Transmission**, 111: 367- 386, 2004.
- GUERRERO, Ana; DE STROOPER, Bart; ARANCIBIA-CÁRCAMO, I. Lorena. Cellular senescence at the crossroads of inflammation and Alzheimer's disease. **Trends in neurosciences**, v. 44, n. 9, p. 714-727, 2021.
- GUL, Zulfiye *et al.* Protective effects of chlorogenic acid and its metabolites on hydrogen peroxide-induced alterations in rat brain slices: a comparative study with resveratrol. **Neurochemical research**, v. 41, p. 2075-2085, 2016.
- GUO, Cong-Cong; JIAO, Chun-hong; GAO, Zhen-Mei. Silencing of LncRNA BDNF-AS attenuates A β 25-35-induced neurotoxicity in PC12 cells by suppressing cell apoptosis and oxidative stress. **Neurological Research**, v. 40, n. 9, p. 795-804, 2018.
- GUO, Tiantian *et al.* Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Molecular neurodegeneration**, v. 15, n. 1, p. 1-37, 2020.
- GUO, Y. *et al.* Functions of amyloid precursor protein in metabolic diseases. **Metabolism**, v. 115, p. 154454, fev. 2021.
- GUO, Yuan-Jin *et al.* Involvement of TLR2 and TLR9 in the anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in HSV-1-infected microglia. **Life sciences**, v. 127, p. 12-18, 2015.
- GUPTA, Shivani; DASMAHAPATRA, Ashok Kumar. Caffeine destabilizes preformed A β protofilaments: Insights from all atom molecular dynamics simulations. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 21, n. 39, p. 22067-22080, 2019.
- GUPTA, Yash *et al.* Protein structure-based in-silico approaches to drug discovery: Guide to COVID-19 therapeutics. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 91, p. 101151, 2023.
- GURUNG, Arun Bahadur *et al.* Molecular modelling studies unveil potential binding sites on human serum albumin for selected experimental and in silico COVID-19 drug candidate molecules. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 1, p. 53-64, 2022.
- HAAS, C. B.; KALININE, E.; ZIMMER, E. R.; HANSEL, G.; BROCHIER, A.W.; OSES, J. P.; PORTELA, L.V.; MULLER, A. P. Brain insulin administration triggers distinct cognitive and neurotrophic responses in young and aged rats, **Mol. Neurobiol.** 26, 2015.
- HALASSA, Michael M.; FELLIN, Tommaso; HAYDON, Philip G. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. **Trends in molecular medicine**, v. 13, n. 2, p. 54-63, 2007.
- HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, n. 3, p. 385-403, 1934.
- HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312-322, 2006b.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Measurement of reactive species. In: Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. **Free Radic. Biol. Med.** 4 ed. Oxford University Press, Oxford, p. 268-340, 2007.

- HAMAGUCHI, Tsuyoshi *et al.* Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid- β aggregation pathway. **The American journal of pathology**, v. 175, n. 6, p. 2557-2565, 2009.
- 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, Junkyu *et al.* Neuroprotective effect of 3, 5-di-O-caffeoylquinic acid on SH-SY5Y cells and senescence-accelerated-prone mice 8 through the up-regulation of phosphoglycerate kinase-1. **Neuroscience**, v. 169, n. 3, p. 1039-1045, 2010.
- HAN, Kun *et al.* Chronic caffeine treatment reverses memory impairment and the expression of brain BDNF and TrkB in the PS1/APP double transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Molecular medicine reports**, v. 8, n. 3, p. 737-740, 2013.
- HANISCH, Uwe-Karsten; KETTENMANN, Helmut. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nature neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 1387-1394, 2007.
- HANWELL, Marcus D. *et al.* Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 1-17, 2012.
- HARPAZ, Eynav *et al.* The effect of caffeine on energy balance. **Journal of basic and clinical physiology and pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 1-10, 2017.
- HEDMAN, A. M., *et al.* Human brain changes across the life span: a review of 56 longitudinal magnetic resonance imaging studies. **Human brain mapping**, 33(8), 1987-2012.
- HEGER, Nicholas E. Predictive testing and alzheimer disease. 2014.
- HEITMAN, Erin; INGRAM, Donald K. Cognitive and neuroprotective effects of chlorogenic acid. **Nutritional Neuroscience**, v. 20, n. 1, p. 32-39, 2017.
- HELMES, E.; OSTBYE, T. Beyond memory impairment: cognitive changes in Alzheimer's disease. **Arch Clin Neuropsychol**, v. 17, n. 2, p. 179-93, Feb 2002. ISSN 0887-6177 (Print) 0887-6177.
- HEPPNER, F. L.; RANSOHOFF, R. M.; BECHER, B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, 16(6), 358-372, 2015.
- HERMAWATI, Ery *et al.* Chlorogenic acid ameliorates memory loss and hippocampal cell death after transient global ischemia. **European Journal of Neuroscience**, v. 51, n. 2, p. 651-669, 2020.
- HIGDON, J. V.; FREI, B. Coffee and health: a review of recent human research. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.46, p.101-123. 2006.
- HIPPIUS, Hanns; NEUNDÖRFER, Gabriele. The discovery of Alzheimer's disease. **Dialogues in clinical neuroscience**, 2022.
- HITMAN, G. A. Coffee: friend or foe for diabetes risk?. **Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association**, v. 31, n. 7, p. 763, 2014.

- HÖLSCHER, Christian. Diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease: insulin signalling impairment in the brain as an alternative model of Alzheimer's disease. 2011.
- HOMAN, David J.; MOBARHAN, Sohrab. Coffee: good, bad, or just fun? A critical review of coffee's effects on liver enzymes. **Nutrition reviews**, v. 64, n. 1, p. 43-46, 2006.
- HONG, Soyon; DISSING-OLESEN, Lasse; STEVENS, Beth. New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease. **Current opinion in neurobiology**, v. 36, p. 128-134, 2016.
- HORWOOD, Jennifer M. *et al.* Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 12, p. 3375-3384, 2006.
- HOWES, M. J.; HOUGHTON, P. J. Ethno-botanical treatment strategies against Alzheimer's disease. **Curr Alzheimer Res**; 1: 67–85, 2012.
- HOYER, S.; LANNERT, H. Long-term abnormalities in brain glucose/ energy metabolism after inhibition of the neuronal insulin receptor: implication of tau-protein. **J Neural Transm Suppl.** 72:195–202, 2007.
- HOYER, S.; MÜLLER, D.; PLASCHKE, K. **Desensitization of brain insulin receptor Effect on glucose/energy and related metabolism.** Springer Vienna, 1994.
- HOYER, Siegfried. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. **European journal of pharmacology**, v. 490, n. 1-3, p. 115-125, 2004.
- HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. N EUROTROPHINS: Roles in Neuronal Development and Function *. p. 677–736, 2001.
- HUANG, J. J.; LIU, X.; WANG, X. Q.; YANG, L. H.; QI, D. S.; YAO, R. Q. Effects of quercetin on the learning and memory ability of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage. **Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi** 14:454-457, 2012.
- HUANG, W. J.; ZHANG, X.; CHEN, W. W. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease (review). **Biomed Rep**; 4(5):519–22, 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, 2015.
- HUXLEY, R.; BARZI, F.; WOODWARD, M. Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analyses of 37 prospective cohort studies. **BMJ**, 332:1-6, 2006.
- IFUKU, Masataka *et al.* Anti-inflammatory/anti-amyloidogenic effects of plasmalogens in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in adult mice. **Journal of neuroinflammation**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2012.

inflammatory cytokines and chemokines. **Immunopharmacology Immunotoxicology**. v. 24, p. 113-119, 2002.

IONESCU-TUCKER, Andra; COTMAN, Carl W. Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 107, p. 86-95, 2021.

IQBAL, K.; LIU, F.; GONG, C. X. **Tau and neurodegenerative disease: the story so far**. Nature reviews Neurology, 12, pp. 15-27, 2016.

ISHIDA, Keiko *et al.* Coffee polyphenols prevent cognitive dysfunction and suppress amyloid β plaques in APP/PS2 transgenic mouse. **Neuroscience Research**, v. 154, p. 35-44, 2020.

ISHRAT, T. *et al.* Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 19, n. 9, p. 636-47, ISSN 0924- 977x, Sep 2009.

ISHRAT, T. *et al.* Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. **Behav. Brain. Res.**, v. 171, p. 9-16, 2006.

ISHRAT, Tauheed *et al.* Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). **European Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 9, p. 636-647, 2009.

ISHRAT, Tauheed *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, 2009.

IŞIK, Mesut; BEYDEMİR, Şükrü. The impact of some phenolic compounds on serum acetylcholinesterase: Kinetic analysis of an enzyme/inhibitor interaction and molecular docking study. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, n. 17, p. 6515-6523, 2021.

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.

ITO, Hideyuki *et al.* "Chlorogenic acid and its metabolite m-coumaric acid evoke neurite outgrowth in hippocampal neuronal cells." **Bioscience, biotechnology, and biochemistry** vol. 72,3, 2008. Doi: 885-8. doi:10.1271/bbb.70670

IZQUIERDO, I. Memória (2. ed.). Porto Alegre, RS: **Artmed**, 2011.

IZQUIERDO, I.; McGAUGH, J.L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behav. Pharmacol.**, v. 11, p. 517-534, 2000.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem**, v. 68, n. 3, p. 285-316, Nov 1997. ISSN 1074-7427. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9398590> >

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. GABA A receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. **Trends. Pharmacol. Sci.**, v. 12, p. 260-265, 1991.

JACK, JR, Clifford R. *et al.* NIA-AA research framework: toward a biological definition of Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 14, n. 4, p. 535-562, 2018.

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

JAHN, Holger. Memory loss in Alzheimer's disease. **Dialogues in clinical neuroscience**, 2022.

JAIN, K. K. The handbook of neuroprotection: Springer Science & Business Media; 2011.

JAWORSKI, Tomasz; BANACH-KASPER, Ewa; GRALEC, Katarzyna. GSK-3 β at the intersection of neuronal plasticity and neurodegeneration. **Neural plasticity**, v. 2019, p. 1-14, 2019.

JEONG, Ji Hee *et al.* Ameliorating effects of aged garlic extracts against A β -induced neurotoxicity and cognitive impairment. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2013.

JESSBERGER, S. *et al.* Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. **Learning & Memory**, v. 16, n. 2, p. 147–154, 2009.

JIA, Huijuan *et al.* Coffee intake mitigated inflammation and obesity-induced insulin resistance in skeletal muscle of high-fat diet-induced obese mice. **Genes & nutrition**, v. 9, p. 1-10, 2014.

JIN, J. Alzheimer Disease. **JAMA**. 313(14):1488, 2015. doi:10.1001/jama.2015.2852

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, G. R.; LEE, S. C.; BROSNAN, C. F. Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. **Neuroscientist**, v. 9, n. 1, p. 10-22, Feb 2003.

JULIAON, Laura M.; GRIFFITHS, Roland R. A critical review of caffeine withdrawal: empirical validation of symptoms and signs, incidence, severity, and associated features. **Psychopharmacology**, v. 176, p. 1-29, 2004.

KALININE, E.; SOUZA, D. O.; CUNHA, R. A.; PORCIÚNCULA, L. O. Caffeine consumption prevents memory impairment, neuronal damage, and adenosine A2A receptors up-regulation in the hippocampus of a rat model of sporadic dementia. **J. Alzheimers Dis.**34(2):509-18, 2013.

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, Pradeep K. *et al.* Mitochondrial dysfunction: a crucial event in okadaic acid (ICV) induced memory impairment and apoptotic cell death in rat brain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 2, p. 311-319, 2011.
- KAMAT, Pradeep Kumar *et al.* A study on neuroinflammatory marker in brain areas of okadaic acid (ICV) induced memory impaired rats. **Life sciences**, v. 90, n. 19-20, p. 713-720, 2012.
- KAMAT, Pradip Kumar. 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, S.; KIM, C. H.; JUNG, H.; KIM, E.; SONG, H. T.; & LEE, J. E. Agmatine ameliorates type 2 diabetes induced-Alzheimer's disease-like alterations in high-fat diet-fed mice via reactivation of blunted insulin signalling. **Neuropharmacology**, 113, 467-479, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.10.029>
- KAPLAN, Gary B. *et al.* Relationship of plasma and brain concentrations of caffeine and metabolites to benzodiazepine receptor binding and locomotor activity. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 248, n. 3, p. 1078-1083, 1989.
- KAR, S.; SLOWIKOWSKI, S. P.; WESTAWAY, D.; MOUNT, H. T. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. **J Psychiatry Neurosci** 29, 427-41, 2004.
- KARTHIKESAN, Krishnamoorthy; PARI, Leelavinothan; MEONN, Venugopal P. Combined treatment of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid exerts potential antihyperglycemic effect on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. **Gen. Physiol. Biophys**, v. 29, n. 1, p. 23-30, 2010.
- KASTER, Manuella P. *et al.* Caffeine acts through neuronal adenosine A2A receptors to prevent mood and memory dysfunction triggered by chronic stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 25, p. 7833-7838, 2015.
- KATO, Morimasa *et al.* Effect of chlorogenic acid intake on cognitive function in the elderly: A pilot study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.
- 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.
- KEMAPPINEN, Susanna *et al.* Impaired TrkB receptor signaling contributes to memory impairment in APP/PS1 mice. **Neurobiology of aging**, v. 33, n. 6, p. 1122. e23-1122. e39, 2012.
- KEMPERMANN, G.; GAST, D.; GAGE, F. H. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. **Ann. Neurol.** 52, 135 e 143, 2002.
- KESHAVARZ, Mojtaba; FARROKHI, Majid Reza; AMIRI, Atena. Caffeine neuroprotective mechanism against β -amyloid neurotoxicity in SHSY5Y cell line: Involvement of adenosine,

ryanodine, and N-methyl-D-aspartate receptors. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 7, n. 4, p. 579, 2017.

KETTENMANN, Helmut *et al.* Physiology of microglia. **Physiological reviews**, v. 91, n. 2, p. 461-553, 2011.

KIM, D.-Y., JUNG, S.-Y., KIM, K., & KIM, C.-J. Treadmill exercise ameliorates Alzheimer disease-associated memory loss through the Wnt signaling pathway in the streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Exercise Rehabilitation**, 12(4), 276–283, 2016.
<https://doi.org/10.12965/jer.1632678.339>

KIM, G. H.; KIM J. E.; RHIE, S. J.; YOON, S. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Exp Neurobiol**; 24(4):325–40, 2015.

KIM, Hyunjin *et al.* Chlorogenic acid ameliorates alcohol-induced liver injuries through scavenging reactive oxygen species. **Biochimie**, v. 150, p. 131-138, 2018.

KIM, T. S.; PAE, C. U.; YOON, S. J.; JANG, W. Y.; LEE, N. J.; KIM, J. J.; LEE, S. J.; LEE, C.; PAIK, I. H.; LEE, C. U. Decreased plasma antioxidants in patients with Alzheimer's disease. **Int. J. Geriatr. Psychiatry** 21, 344–348, 2006.

KIM, Thomas A. *et al.* Adult hippocampal neurogenesis and its impairment in Alzheimer's disease. **Zoological Research**, v. 43, n. 3, p. 481, 2022.

KIM, Youngyo; JE, Youjin; GIOVANNUCCI, Edward. Coffee consumption and all-cause and cause-specific mortality: a meta-analysis by potential modifiers. **European journal of epidemiology**, v. 34, p. 731-752, 2019.

KIROVA, Anna-Mariya; BAYS, Rebecca B.; LAGALWAR, Sarita. Working memory and executive function decline across normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. DOCKING AND SCORING IN VIRTUAL SCREENING FOR DRUG DISCOVERY: methods and applications. **Nature Reviews**, v. 3, p. 935-949, 2004.

KLUNK, W.; ENGLER, H.; ONRDBERG, A.; WANG, Y.; BLOMQUIST, G.; HOLT, D.; BERGSTROM, M.; SAVITCHEVA, I.; HUANG, G.; ESTRADA, S.; AUSEN, B.; DEBNATH, M.; BARLETTA, J.; PRICE, J.; SANDELL, J.; LOPRESTI, B.; WALL, A.; KOIVISTO, P.; ANTONI, G.; MATHIS, C.; LANGSTROM, B. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. **Annals of Neurology**, 55 (3), 306-319, 2004. DOI: [10.1002/ana.20009](https://doi.org/10.1002/ana.20009)

KNEZOVIC, A.; OSMAONVIC-BARILAR, J.; CURLIN, M.; HOF, P. R.; SIMIC, G.; RIEDERER, P, *et al.* Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. **J Neural Transm**;122(4):577–92, 2015.

KOCH, Giacomo; SPAMPINATO, Danny. Alzheimer disease and neuroplasticity. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 184, p. 473-479, 2022.

KONPMAN, David S.; JONES, David T.; GREICIUS, Michael 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, 2021.

KOON, B. *et al.* Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 62, p. 22-27, 1998.

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.

KRAKUER, T. The polyphenol chlorogenic acid inhibits staphylococcal exotoxin-induced inflammatory cytokines and chemokines. **Immunopharmacology Immunotoxicology**. v. 24, p. 113-119, 2002.

KRASKA, Audrey *et al.* In vivo cross-sectional characterization of cerebral alterations induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin. 2012.

KRASKA. A.; SANTIN, M. D.; DORIEUX, O.; JOSEPH-MATHURIN, N.; BOURRIN, E.; PETIT, F, *et al.* In vivo cross-sectional characterization of cerebral alterations induced by intracerebroven- tricular administration of streptozotocin. **PLoS One**; 7(9):e46196, 2012.

KUMAR, A. *et al.* Neuroprotective effects of resveratrol against intracerebroventricular colchicine-induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. **Pharmacology**, v. 79, n. 1, p. 17-26, 2007.

KUMAR, A., & SINGH, N. Inhibitor of Phosphodiesterase-4 improves memory deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neuropathological alterations in mouse models of dementia of Alzheimer's Type. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 88, 698–707, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.059>

KUMAR, Ashwani *et al.* Computational and in-vitro validation of natural molecules as potential acetylcholinesterase inhibitors and neuroprotective agents. **Current Alzheimer Research**, v. 16, n. 2, p. 116-127, 2019.

KUMAR, Gaurav *et al.* Pharmacokinetics and brain penetration study of chlorogenic acid in rats. **Xenobiotica**, v. 49, n. 3, p. 339-345, 2019.

KUMAR, R.; JAGGI, A. S.; SINGH, N. Effects of erythropoietin on memory deficits and brain oxidative stress in the mouse models of dementia. **Korean J Physiol Pharmacol** 14:345–352, 2010.

KUSHNAREVA, Y, NEWMAYER, D.D. Bioenergetics and cell death. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v. 1201 p. 50-7. 2010.

KWON, N. S. *et al.* Nitric oxide generation from streptozotocin. **FASEB journal**, v. 8, n. 8, p. 529–533, 1994.

- KWON, Seung-Hwan *et al.* Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. **European journal of pharmacology**, v. 649, n. 1-3, p. 210-217, 2010.
- LAFRANCONI, Alessandra *et al.* Coffee intake decreases risk of postmenopausal breast cancer: a dose-response meta-analysis on prospective cohort studies. **Nutrients**, v. 10, n. 2, p. 112, 2018.
- LALONDE, R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. **Neuroscience and biobehavioral reviews** 26:91–104, 2002.
- LAMMICH, S. *et al.* Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 7, p. 3922-7, Mar 30 1999.
- LANFRAY, D.; ARTHAUD, S.; OUELLET, J.; COMPÈRE, V.; DO REGO, J. L.; LEPRINCE, J.; LEFRANC, B.; CASTEL, H. *et al.* Gliotransmission and brain glucose sensing: critical role of endozepines. **Diabetes** 62:801–810, 2013.
- LANGA, K. M.; LARSON, E. B.; CRIMMINS, E. M.; FAUL, J. D.; LEVINE, D. A.; KABETO, M. U.; & WEIR, D. R. A comparison of the prevalence of dementia in the United States in 2000 and 2012. **JAMA Internal Medicine**, v. 177, n.(1), p. 51–58, 2017. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2016.680>.
- LANGLET, F.; MULLIER, A.; BOURET, S. G.; PREVOT, V.; DEHOUCK, B. Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. **J Comp Neurol** 521: 3389–3405, 2013.
- LANNERT, H.; HOYER, S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. **Behav Neurosci**, v. 112, n. 5, p. 1199-208, Oct 1998. ISSN 0735-7044. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9829797> >
- LAO, Patrick J. *et al.* Amyloid, cerebrovascular disease, and neurodegeneration biomarkers are associated with cognitive trajectories in a racially and ethnically diverse, community-based sample. **Neurobiology of Aging**, v. 117, p. 83-96, 2022.
- LAO-PEREGRÍN, Cristina *et al.* Caffeine-mediated BDNF release regulates long-term synaptic plasticity through activation of IRS2 signaling. **Addiction Biology**, v. 22, n. 6, p. 1706-1718, 2017.
- LARA, Diogo R. Caffeine, mental health, and psychiatric disorders. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 20, n. s1, p. S239-S248, 2010.
- LARSSON, Susanna C.; ORSINI, Nicola. Coffee consumption and risk of dementia and Alzheimer's disease: A dose-response meta-analysis of prospective studies. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1501, 2018.
- LAURENT, Cyril *et al.* Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like tau pathology. **Neurobiology of aging**, v. 35, n. 9, p. 2079-2090, 2014.
- LAZAROV, O.; HOLLANDS, C. Hippocampal neurogenesis: Learning to remember. **Progress in Neurobiology**, v. 138–140, p. 1–18, mar. 2016.

LEE, Choong Hyun *et al.* Decreased insulin-like growth factor-I and its receptor expression in the hippocampus and somatosensory cortex of the aged mouse. **Neurochemical research**, v. 39, p. 770-776, 2014.

LEE, Tae-Kyeong *et al.* Experimental pretreatment with chlorogenic acid prevents transient ischemia-induced cognitive decline and neuronal damage in the hippocampus through anti-oxidative and anti-inflammatory effects. **Molecules**, v. 25, n. 16, p. 3578, 2020.

LEITE, G. D. E. O.; LEITE, L. H.; SAMPAIO, R. D. E.; ARARUNA, M. K.; DE MENEZES, I. R.; DA COSTA, J.G.; CAMPOS, A. R. (-)-Alpha-Bisabolol attenuates visceral nociception and inflammation in mice. **Fitoterapia** 82, 208–211, 2011.

LEITE, Marlon Régis *et al.* Protective effect of caffeine and a selective A2A receptor antagonist on impairment of memory and oxidative stress of aged rats. **Experimental gerontology**, v. 46, n. 4, p. 309-315, 2011.

LELOUP, C., *et al.*,. Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei. **Brain Research**. 638, 221-226, 1994.

LENT, R. Cem bilhões de neurônios?: Conceitos fundamentais de neurociência (2. ed.). São Paulo, SP: **Atheneu**, 2010.

LEÓN-CARMONA, Jorge Rafael; GALANO, Annia. Is caffeine a good scavenger of oxygenated free radicals?. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 15, p. 4538-4546, 2011.

LESTER-COLL, N.; RIVERA, E.; SOSCIA, S.; DOIRON, K.; WANDS, J.; DE LA MONTE, S. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic alzheimer's disease. **Journal of Alzheimers Disease**, v. 9, n. 1, p. 13–33, 2006.

LI, L., QIN, L., LU, H. LONG, LI, P. J., SONG, Y. J., & YANG, R. L. Methylene blue improves streptozotocin-induced memory deficit by restoring mitochondrial function in rats. **Brain Research**, 1657, 208–214, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.12.024>

LI, M.; CHEN, L.; LEE, D. H.; YU, L. C.; ZHANG, Y. The role of intracellular amyloid beta in Alzheimer's disease. In: *Prog Neurobiol*, vol 83. vol 3. **England**, pp 131–139, 2007. doi:10.1016/j.pneurobio.2007.08.002

LI, Yongjin *et al.* Neuroprotective effects of chlorogenic acid against apoptosis of PC12 cells induced by methylmercury. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, n. 1, p. 13-21, 2008.

LIM, Dong Wook *et al.* Chlorogenic Acid from Hawthorn berry (*Crataegus pinnatifida* fruit) prevents stress hormone-induced depressive behavior, through monoamine oxidase b-reactive oxygen species signaling in hippocampal astrocytes of mice. **Molecular nutrition & food research**, v. 62, n. 15, p. 1800029, 2018.

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.

LIU *et al.*,. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. **J Pathol**, v. 225, n. 1, p. 54-62, Sep 2011.

- LIU, Cui-Cui *et al.* Chlorogenic acid prevents inflammatory responses in IL-1 β -stimulated human SW-1353 chondrocytes, a model for osteoarthritis. **Molecular medicine reports**, v. 16, n. 2, p. 1369-1375, 2017.
- LIU, Sen *et al.* Exosomes derived from bone-marrow mesenchymal stem cells alleviate cognitive decline in AD-like mice by improving BDNF-related neuropathology. **Journal of Neuroinflammation**, v. 19, n. 1, p. 35, 2022.
- LIVINGSTON, Gill *et al.* Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. **The Lancet**, v. 396, n. 10248, p. 413-446, 2020.
- LOFTFIELD, Erikka *et al.* Association of coffee drinking with mortality by genetic variation in caffeine metabolism: findings from the UK Biobank. **JAMA internal medicine**, v. 178, n. 8, p. 1086-1097, 2018.
- LOFTFIELD, Erikka *et al.* Associations of Coffee Drinking with Systemic Immune and Inflammatory Markers Coffee and Inflammation. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 24, n. 7, p. 1052-1060, 2015.
- LOIZZO, M. R. *et al.* Chemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils. **Food Chem**; 117: 174–180, 2009.
- LONDZIN, Piotr *et al.* Potential of caffeine in Alzheimer's disease—a review of experimental studies. **Nutrients**, v. 13, n. 2, p. 537, 2021.
- LONG-SMITH, Caitriona M. *et al.* The diabetes drug liraglutide ameliorates aberrant insulin receptor localisation and signalling in parallel with decreasing both amyloid- β plaque and glial pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neuromolecular medicine**, v. 15, p. 102-114, 2013.
- LOPES, João P.; PLIÁSSOVA, Anna; CUNHA, Rodrigo A. The physiological effects of caffeine on synaptic transmission and plasticity in the mouse hippocampus selectively depend on adenosine A1 and A2A receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 166, p. 313-321, 2019.
- LOPEZ, Jose A. Soria; GONZÁLEZ, Hector M.; LÉGER, Gabriel C. Alzheimer's disease. *Handbook of clinical neurology*, v. 167, p. 231-255, 2019.
- LOU, Lixia *et al.* Chlorogenic acid induces apoptosis to inhibit inflammatory proliferation of IL-6-induced fibroblast-like synoviocytes through modulating the activation of JAK/STAT and NF- κ B signaling pathways. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 11, n. 5, p. 2054-2060, 2016.
- LUCAS, José J. *et al.* Decreased nuclear β -catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3 β conditional transgenic mice. **The EMBO journal**, v. 20, n. 1-2, p. 27-39, 2001.
- LUCAS, Michel *et al.* Coffee, caffeine, and risk of completed suicide: results from three prospective cohorts of American adults. **The World Journal of Biological Psychiatry**, v. 15, n. 5, p. 377-386, 2014.
- LULL, Melinda E.; BLOCK, Michelle L. Microglial activation and chronic neurodegeneration. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 4, p. 354-365, 2010.

LY, P. T. T.; CAI, F.; & SONG, W. Detection of Neuritic Plaques in Alzheimer's Disease Mouse Model Video Link. **J. Vis. Exp.**, 53(10), 2011. <https://doi.org/10.3791/2831>

M YELANCHEZIAN, Y. Mukish *et al.* Neuroprotective effect of caffeine in Alzheimer's disease. **Molecules**, v. 27, n. 12, p. 3737, 2022.

MADEIRA, Maria H. *et al.* Having a coffee break: the impact of caffeine consumption on microglia-mediated inflammation in neurodegenerative diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, 2017.

MAIA, L.; DE MENDONÇA, A. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease?. **European journal of neurology**, v. 9, n. 4, p. 377-382, 2002.

MATTSON, Mark P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 1, n. 2, p. 120-130, 2000.

MCCALL, Anthony L. Cerebral glucose metabolism in diabetes mellitus. **European journal of pharmacology**, v. 490, n. 1-3, p. 147-158, 2004.

MCCARTY, Mark F. A chlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. **Medical hypotheses**, v. 64, n. 4, p. 848-853, 2005.

MCCUSKER, Rachel R.; GOLDBERGER, Bruce A.; CONE, Edward J. Caffeine content of specialty coffees. **Journal of analytical toxicology**, v. 27, n. 7, p. 520-522, 2003.

MCKHANN, G.M.; KONPMAN, D.S.; CHERTKOW, H.; HYMAN, B.T.; JACK, C.R.; KAWAS, C.H.; KLUNK, W.E.; KOROSHETZ, W.J.; MANLY, J.J.; MAYEUX, R.; MOHS, R.C.; MORRIS, J.C.; ROSSOR, M.N.; SCHELTENS, P.; CARRILLO, M.C.; THIES, B.; WEINTRAUB, S.; MEGA, M. S. Differential diagnosis of dementia: clinical examination and laboratory assessment. **Clin. Cornerstone**, v. 4, p. 53-65, 2002.

MEDINA, Jorge H.; VIOLA, Haydee. ERK1/2: A key cellular component for the formation, retrieval, reconsolidation and persistence of memory. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, p. 361, 2018.

MEHAN, S. *et al.* JNK: a stress-activated protein kinase therapeutic strategies and involvement in Alzheimer's and various neurodegenerative abnormalities. **J Mol Neurosci**, v. 43, n. 3, p. 376-90, Mar 2011. ISSN 0895-8696.

MENCHOLA, M.; WEISS, B. D. Addressing Alzheimer's: a pragmatic approach. **J. Fam. Pract.**, 2015.

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.

MIAO, Mingsan *et al.* Protective effect of chlorogenic acid on the focal cerebral ischemia reperfusion rat models. **Saudi pharmaceutical journal**, v. 25, n. 4, p. 556-563, 2017.

MIAO, Mingsan; XIANG, Liling. Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid. **Advances in pharmacology**, v. 87, p. 71-88, 2020.

- MICEK, Agnieszka *et al.* Caffeinated and decaffeinated coffee consumption and melanoma risk: a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 69, n. 4, p. 417-426, 2018.
- MICHAEL, T.; LIN, M.; FLINT, BEAL. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, p. 787- 795, 2006.
- MICHAŁOWSKA-WENDER, G. *et al.* On the lack of a clear-cut association between alpha-2-macroglobulin deletion and the risk of Alzheimer disease in **Poland**. **Folia. Neuropathol**, 2014.
- MIKAMI, Yoshinori; YAMAZAWA, Toshiko. Chlorogenic acid, a polyphenol in coffee, protects neurons against glutamate neurotoxicity. **Life Sciences**, v. 139, p. 69-74, 2015.
- MILLÁN, C.; MARTÍNEZ, F.; CORTÉS-CAMPOS, C.; LIZAMA, I.; YAÑEZ, M. J.; LLAONS, P.; REINICKE, K.; RODRÍGUEZ, F. *et al.* Glial glucokinase expression in adult and post-natal development of the hypothalamic region. **ASN Neuro** 2:e00035, 2010.
- MISHRA, S. K.; SINGH, S.; SHUKLA, S.; SHUKLA, R. Intracerebroventricular streptozotocin impairs adult neurogenesis and cognitive functions via regulating neuroinflammation and insulin signaling in adult rats. **Neurochemistry International**, 113, 56–68, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.11.012>
- MIYAMAE, Yusaku *et al.* Protective effects of caffeoylquinic acids on the aggregation and neurotoxicity of the 42-residue amyloid β -protein. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5844-5849, 2012.
- 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.
- MORRIS, Garrett M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009.
- MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **J. Neurosci. Methods**. 11: 47-60, 1984.
- MORS, W. *et al.* Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 627–642, 2000.
- MOSCONI, L.; SORBI, S.; DE LEON, M. J.; LI, Y.; NACMIAS, B.; MYOUNG, P. S.; TSUI, W.; GINESTRONI, A. *et al.* Hypometabolism exceeds atrophy in presymptomatic early-onset familial Alzheimer's disease. **J Nucl Med** 47:1778–1786, 2006.
- MOSCOVITCH, M. Memory and working-with-memory: A component process model based on modules and central systems. **J. Cognit. Neurosci.**, v. 4, n.3, p. 257-267, 1992.
- MOY, Gregory A.; MCNAY, Ewan C. Caffeine prevents weight gain and cognitive impairment caused by a high-fat diet while elevating hippocampal BDNF. **Physiology & behavior**, v. 109, p. 69-74, 2013.

- MRAK, Robert E.; GRIFFIN, W. Sue T. Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 22, n. 6, p. 903-908, 2001.
- MULEY, Arti; MULEY, Prasad; SHAH, Monali. Coffee to reduce risk of type 2 diabetes?: a systematic review. **Current diabetes reviews**, v. 8, n. 3, p. 162-168, 2012.
- 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.
- NABAVI, Seyed Fazel *et al.* Chlorogenic acid and mental diseases: from chemistry to medicine. **Current neuropharmacology**, v. 15, n. 4, p. 471, 2017.
- NAGAHARA, Alan H. *et al.* Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. **Nature medicine**, v. 15, n. 3, p. 331-337, 2009.
- NAOI, Makoto *et al.* Mitochondria in neuroprotection by phytochemicals: Bioactive polyphenols modulate mitochondrial apoptosis system, function and structure. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 10, p. 2451, 2019.
- NATELLA, Fausta *et al.* Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: Structure-activity relation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 4, p. 1453-1459, 1999.
- NAVEED, M. *et al.* Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 97, n. August 2017, p. 67-74, 2018.
- NAZEM, A.; SANKOWSKI, R.; BACHER, M.; AL-ABED, Y. Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease. **J. Neuroinflammation**, 12, 74, 2015.
- NCBI - National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 2519, Caffeine. Retrieved December 1, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine>.
- NEHLIG, Astrid. Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 4, p. 563-576, 1999.
- NEHLIG, Astrid. Interindividual differences in caffeine metabolism and factors driving caffeine consumption. **Pharmacological reviews**, v. 70, n. 2, p. 384-411, 2018.
- NG, Ted Kheng Siang *et al.* Decreased serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in patients with Alzheimer's disease (AD): a systematic review and meta-analysis. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 2, p. 257, 2019.
- 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.
- NISHITSUJI, K.; WATANABE, S.; XIAO, J.; NAGATOMO, R.; OGAWA, H.; TSUNEMATSU, T., ... TSUNEYAMA, K. Effect of coffee or coffee components on gut

microbiome and short-chain fatty acids in a mouse model of metabolic syndrome. **Scientific Reports**, 8(1), 1–10, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34571-9>

OBOH, Ganiyu *et al.* Comparative study on the inhibitory effect of caffeic and chlorogenic acids on key enzymes linked to Alzheimer's disease and some pro-oxidant induced oxidative stress in rats' brain-*in vitro*. **Neurochemical research**, v. 38, p. 413-419, 2013.

OBOH, Ganiyu; OGUNSUYI, Opeyemi Babatunde; OLONISOLA, Oluwaseyi Emmanuel. Does caffeine influence the anticholinesterase and antioxidant properties of donepezil? Evidence from *in vitro* and in vivo studies. **Metabolic brain disease**, v. 32, p. 629-639, 2017.

OCHIAI, Ryuji *et al.* Effect of chlorogenic acids on cognitive function in mild cognitive impairment: a randomized controlled crossover trial. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 72, n. 4, p. 1209-1216, 2019.

OGUT, Eren *et al.* The influence of syringic acid treatment on total dopamine levels of the hippocampus and on cognitive behavioral skills. **International Journal of Neuroscience**, v. 132, n. 9, p. 901-909, 2022.

OHARA, T.; DOI, Y.; NIONMIYA, T.; HIRAKAWA, Y.; HATA, J.; IWAKI, T.; KANBA, S.; KIYOHARA, Y. Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: the Hisayama study. **Neurology**, v. 77 pp. 1126-1134, 2011.

OKELLO, Edward J.; LEYLABI, Ramin; MCDOUGALL, Gordon J. Inhibition of acetylcholinesterase by green and white tea and their simulated intestinal metabolites. **Food & function**, v. 3, n. 6, p. 651-661, 2012.

ONO, Kenjiro *et al.* Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's β -amyloid fibrils *in vitro*. **Journal of neuroscience research**, v. 75, n. 6, p. 742-750, 2004.

ONO, Kenjiro *et al.* Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols *in vitro*: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 87, n. 1, p. 172-181, 2003.

ONTAWONG, Atcharaporn *et al.* Chlorogenic acid rich in coffee pulp extract suppresses inflammatory status by inhibiting the p38, MAPK, and NF- κ B pathways. **Heliyon**, v. 9, n. 3, 2023.

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

ORHAN, I. E. *et al.* Flavonoids and dementia: an update. **Current medicinal chemistry**, v. 22, n. 8, p. 1004-1015, 2015.

OTHMAN, Manal A. *et al.* Caffeine protects against hippocampal alterations in type 2 diabetic rats via modulation of gliosis, inflammation and apoptosis. **Cell and Tissue Research**, p. 1-24, 2022.

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

- PACHECO, S. M.; SOARES, M. S. P.; GUTIERRES, J. M.; GERZSON, M. F. B.; CARVALHO, F. B.; AZAMBUJA, J. H.; ... SPANEVELLO, R. M. Anthocyanins as a potential pharmacological agent to manage memory deficit, oxidative stress and alterations in ion pump activity induced by experimental sporadic dementia of Alzheimer's type. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 56, 193–204, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.02.014>
- PAL, S.; TYLER, J. K. Epigenetics and aging. **Sci Adv**, v. 2, n. 7, p. e1600584, Jul 2016.
- PALOP, J.; MUCKE, L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nature Neuroscience*, v. 13, n. 10, p. 812–818, 2010.
- PAPALIAGKAS, Vasileios *et al.* CSF Biomarkers in the Early Diagnosis of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 10, p. 8976, 2023.
- PARK, S. J.; KIM, Y. H.; NAM, G. H.; CHOE, S. H.; LEE, S. R.; KIM, S. U, *et al.* Quantitative expression analysis of APP pathway and tau phosphorylation-related genes in the ICV STZ-induced non-human primate model of sporadic Alzheimer's disease. **Int J Mol Sci**; 16:2386-2402, 2015.
- PARK, Song-Yi *et al.* Association of coffee consumption with total and cause-specific mortality among nonwhite populations. **Annals of internal medicine**, v. 167, n. 4, p. 228-235, 2017.
- PATHAN, A. R. *et al.* Chronic administration of pioglitazone attenuates intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. **Life Sci**, v. 79, n. 23, p. 2209-16, Nov 2 2006. ISSN 0024-3205 (Print) 0024- 3205.
- PATJA, Kristiina *et al.* Effects of smoking, obesity and physical activity on the risk of type 2 diabetes in middle-aged Finnish men and women. **Journal of internal medicine**, v. 258, n. 4, p. 356-362, 2005.
- PAXIONS, G.; FRANKLIN, K. B. The mouse brain in stereotaxic coordinates. **Gulf Professional Publishing**, 2004.
- PEITZIKA, Stergiani-Chrysovalanti; PONTIKI, Eleni. A Review on Recent Approaches on Molecular Docking Studies of Novel Compounds Targeting Acetylcholinesterase in Alzheimer Disease. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1084, 2023.
- PELLOW, Sharon *et al.* Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.
- PENG, Shiyong *et al.* Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 93, n. 6, p. 1412-1421, 2005.
- PENG, Shiyong *et al.* Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 93, n. 6, p. 1412-1421, 2005.

- PERDAHL, E.; ADOLFSSON, R.; ALAFUZOFFI.; ALBERT, K. A.; NESTLER, E. J.; GREENGARD, P.; WINBLAD, B. Synapsin I (protein I) in different brain regions in senile dementia of Alzheimer type and in multi-infarct. Dementia. **J Neural Transm** 60:133–141, 1984.
- PÉREZ, M. A.; ARANCIBIA, S.R. Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia? **Arch. Neurocién.**, v. 12, p. 45-54, 2007.
- PERL, D. P. Neuropathology of Alzheimer's disease and related disorders. **Neurol. Clin.**, v. 18, p. 847, 2000.
- PERLAKI, Gabor *et al.* Coffee consumption may influence hippocampal volume in young women. **Brain imaging and behavior**, v. 5, p. 274-284, 2011.
- PERRY, V. H.; NICOLL, J. A.; HOLMES, C. Microglia in neurodegenerative disease. **Nat Ver Neurol**; 6:193-201, 2010.
- PETTERSEN, Eric F. *et al.* UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein Science**, v. 30, n. 1, p. 70-82, 2021.
- PHIEL, C.; WILSON, C.; LEE, V.; KLEIN, P. Gsk-3alpha regulates production of alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature*, v. 423, n. 6938, p. 435–439, 2003.
- PHILIPSON, O.; LORD, A.; GUMUCIO, A.; O'CALLAGHAN, P.; LANNFELT, L.; NILSSON, L.N. Animal models of amyloid-beta-related pathologies in Alzheimer's disease. **FEBS J.**, v.277, p.1389-409, 2010.
- POHANKA, Miroslav; DOBES, Petr. Caffeine inhibits acetylcholinesterase, but not butyrylcholinesterase. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 5, p. 9873-9882, 2013.
- POOLE, Robin *et al.* Coffee consumption and health: umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes. **bmj**, v. 359, 2017.
- POOLER, A.; ONBLE, W.; HANGER, D. P. A role for tau at the synapse in alzheimer's disease pathogenesis. *Neuropharmacology*, v. 76, p. 1–8, 2014.
- PORAT, Yair; ABRAMOWITZ, Adel; GAZIT, Ehud. Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. **Chemical biology & drug design**, v. 67, n. 1, p. 27-37, 2006.
- PRASANNA, Pragma *et al.* Microfluidic platforms to unravel mysteries of Alzheimer's Disease: How far have we come?. **Life**, v. 11, n. 10, p. 1022, 2021.
- PRICKAERTS, J. *et al.* Nitric oxide synthase does not mediate neurotoxicity after an icv injection of streptozotocin in the rat. **Journal of neural transmission**, v. 107, n. 7, 2000.
- PRILLAMAN, McKenzie. Heralded Alzheimer's drug works—but safety concerns loom. **Nature**, v. 612, n. 7939, p. 197-198, 2022.

PRINCE, M. J. *et al.*, World Alzheimer Report 2016 - Improving healthcare for people living with dementia: Coverage, quality and costs now and in the future. **Alzheimer's Disease International. London**, p.131, 2016.

PUGLIELLI, L.; TANZI, R. E.; KOVACS, D. M. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. **Nature Neurosci.**, v. 4, p. 345-351, 2003.

QI, Hui; LI, Shixue. Dose-response meta-analysis on coffee, tea and caffeine consumption with risk of Parkinson's disease. **Geriatrics & gerontology international**, v. 14, n. 2, p. 430-439, 2014.

QIU, Chengxuan; KIVIPELTO, Miia; VON STRAUSS, Eva. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. **Dialogues in clinical neuroscience**, 2022.

QUEIROZ, J. S. B. Modelo de Demência de Alzheimer Esporádica induzida por injeção intracerebroventricular de estreptozotocina: avaliação da memória em camundongos, 48 p, 2015. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, v. 362, n. 4, p. 329-44, Jan 28 2010.

RAI, Shivika *et al.* A study on neuroinflammation and NMDA receptor function in STZ (ICV) induced memory impaired rats. **Journal of neuroimmunology**, v. 254, n. 1-2, p. 1-9, 2013.

RAI, Shivika *et al.* Glial activation and post-synaptic neurotoxicity: the key events in Streptozotocin (ICV) induced memory impairment in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 117, p. 104-117, 2014.

RAJASEKAR, N. *et al.* Protection of streptozotocin induced insulin receptor dysfunction, neuroinflammation and amyloidogenesis in astrocytes by insulin. **Neuropharmacology**, v. 86, p. 337-352, 2014.

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, 2013.

RANI, V.; DESHMUKH, R.; JASWAL, P.; KUMAR, P.; BARIWAL, J. Alzheimer's disease: Is this a brain specific diabetic condition? **Physiology & Behavior**, 164; 259-267, 2016.

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**, 2016. <https://doi.org/10.1007/s12640-016-9684-7>

RAZA, Muhammad Ummear; CHHABRA, Kavaljit H. Osmotic Minipump Implantation for Increasing Glucose Concentration in Mouse Cerebrospinal Fluid. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 194, p. e65169, 2023.

REAGAN-SHAW, Shannon; NIHAL, Minakshi; AHMAD, Nihal. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB journal**, v. 22, n. 3, p. 659-661, 2008.

REBAI, Olfa *et al.* Differential molecular targets for neuroprotective effect of chlorogenic acid and its related compounds against glutamate induced excitotoxicity and oxidative stress in rat cortical neurons. **Neurochemical research**, v. 42, p. 3559-3572, 2017

REDDY, Arubala P.; RAVICHANDRAN, Janani; CARKACI-SALLI, Nurgul. Neural regeneration therapies for Alzheimer's and Parkinson's disease-related disorders. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 4, p. 165506, 2020.

REES, T.; HAMMOND, P. I.; SOREQ, H.; YOUNKIN, S.; BRIMIJOIN, S. Acetylcholinesterase promotes beta- amyloid plaques in cerebral cortex. *Neurobiology of Aging* 24:777–787, 2003. PMID: 12927760

REITZ, C.; BRAYNE, C.; MAYEUX, R. Epidemiology of Alzheimer disease. **Nat Rev Neurol**, v. 7, n. 3, p. 137-52, Mar 2011. ISSN 1759-4758.

REITZ, C.; HONIG, L.; VONSATTEL, J. P.; TANG, M. X.; MAYEUX, R. Memory performance is related to amyloid and tau pathology in the hippocampus. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 80:715–721, 2009. doi:10.1136/jnnp.2008.154146

RITCHIE, K.; CARRIERE, I.; De MENDONCA, A.; PORTET, F.; DARTIGUES, J. F.; ROUAUD, O.; BARBERGER-GATEAU, P.; ANCELIN, M. L. The neuroprotective effects of caffeine: A prospective population study (the Three City Study). **Neurology**, 69:536-545, 2007.

RIZOR, A. *et al.* Astrocytic Oxidative/Nitrosative Stress Contributes to Parkinson's Disease Pathogenesis: The Dual Role of Reactive Astrocytes. **Antioxidants** 2019, Vol. 8, Page 265, v. 8, n. 8, p. 265, 1 ago. 2019.

ROBERT, R. *et al.* Engineered antibody intervention strategies for Alzheimer's disease and related dementias by targeting amyloid and toxic oligomers. **Protein Eng Des Sel**, v. 22, n. 3, p. 199-208, Mar 2009. ISSN 1741-0134. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18927231> >

RODRIGUES, A.P.; ANDRADE, L.H.C. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais utilizadas pela comunidade de Inhamã, Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, 16, 3,721-730, 2014.

RODRIGUEZ, G. *et al.* Psychological and social aspects in management of Alzheimer's patients: an inquiry among caregivers. **Neurol Sci**, v. 24, n. 5, p. 329-35, Dec 2003. ISSN 1590-1874 (Print) 1590-1874.

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, 2019.

ROJAS-GONZÁLEZ, Alexis *et al.* Coffee chlorogenic acids incorporation for bioactivity enhancement of foods: A review. **Molecules**, v. 27, n. 11, p. 3400, 2022.

ROSTAMI, Farzaneh *et al.* Streptozotocin-induced hippocampal astrogliosis and insulin signaling malfunction as experimental scales for subclinical sporadic Alzheimer model. **Life sciences**, v. 188, p. 172-185, 2017.

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.

ROY, Anitha; RAJAGOPAL, Ponnulakshmi; THANGAVELU, Lakshmi. Molecular docking analysis of compounds from *Lycopersicon esculentum* with the insulin receptor to combat type 2 diabetes. **Bioinformation**, v. 16, n. 10, p. 748, 2020.

RUIFENG, Gao *et al.* Chlorogenic acid attenuates lipopolysaccharide-induced mice mastitis by suppressing TLR4-mediated NF- κ B signaling pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 729, p. 54-58, 2014.

RUMMEL, Nicole G.; BUTTERFIELD, D. Allan. Altered metabolism in Alzheimer disease brain: Role of oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 36, n. 16-18, p. 1289-1305, 2022.

SAITOU, Katsuyoshi *et al.* Effect of chlorogenic acids on cognitive function: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1337, 2018.

SALENTIN, Sebastian *et al.* PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W443-W447, 2015.

SALKOVIC-PETRISIC, M.; HOYER, S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. **J Neural TransmSuppl** 72, 217– 233, 2007.

SALKOVIC-PETRISIC, M.; KNEZOVIC, A.; HOYER, S.; RIEDERER, P. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. **J. Neural Transm.** (Vienna) 120, 233e252, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0877-9>

SALKOVIC-PETRISIC, M.; TRIBL, F.; SCHMIDT, M.; HOYER, S.; RIEDERER, P. Alzheimer- like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. **J Neurochem** 96, 1005-15, 2006.

SALLABERRY, Cássia *et al.* Chronic caffeine prevents changes in inhibitory avoidance memory and hippocampal BDNF immunoccontent in middle-aged rats. **Neuropharmacology**, v. 64, p. 153-159, 2013.

SANTANA-GÁLVEZ, J.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A. Chlorogenic acid: Recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 7–9, 2017.

- SANTOS, M. D.; DOS, ALMEIDA, M. C. Evaluation of the Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol Chlorogenic Acid. **Biol Pharm Bull.** 29: 2236- 2240, 2006.
- SANTOS, Roseane Maria Maia; LIMA, Darcy Roberto Andrade. Coffee consumption, obesity and type 2 diabetes: a mini-review. **European journal of nutrition**, v. 55, p. 1345-1358, 2016.
- SAPCANIN, A. *et al.* Antioxidant capacity in rat brain after ICV treatment with streptozotocin and alloxan—a preliminary study. **Neurotoxicity research**, v. 13, p. 97-104, 2008.
- SARRIÁ, Beatriz *et al.* Regularly consuming a green/roasted coffee blend reduces the risk of metabolic syndrome. **European journal of nutrition**, v. 57, p. 269-278, 2018.
- SARTER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D. N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. **Psychopharmacology** 94: 491-495, 1988.
- SARTORIUS, T.; PETER, A.; HENI, M.; MAETZLER, W.; FRITSCHKE, A.; HEARING, H.-U.; HENNIGE, A. M. The brain response to peripheral insulin declines with age: a contribution of the blood-brain barrier? **PLoS One** 10, e 0126804, 2015.
- SATO, N.; TAKEDA, S.; UCHIO-YAMADA, K.; UEDA, H.; FUJISAWA, T.; RAKUGI, H.; MORISHITA, R. Role of insulin signaling in the interaction between Alzheimer disease and diabetes mellitus: a missing link to therapeutic potential. 2011.
- SAXENA, G.; PATRO, I, K.; NATH, C. ICV STZ induced impairment in memory and neuronal mitochondrial function: a protective role of nicotinic receptor. **Behav Brain Res.** 224:50–57, 2011.
- SAXENA, Gunjan *et al.* Effect of donepezil and tacrine on oxidative stress in intracerebral streptozotocin-induced model of dementia in mice. **European journal of pharmacology**, v. 581, n. 3, p. 283-289, 2008.
- SAXENA, Gunjan *et al.* Melatonin alleviates memory deficits and neuronal degeneration induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 94, n. 3, p. 397-403, 2010.
- SCARMEAS, N.; LUCHSINGER, J.A.; SCHUPF, N.; BRICKMAN, A.M.; COSENTION, S.; TANG, M.X.; STERN, Y. Physical Activity, Diet, and Risk of **Alzheimer Disease**. **JAMA**, v. 302, p. 627- 637, 2009.
- SCHACHTER, A. S.; DAVIS, K. L. Alzheimer's disease. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 2, n. 2, p. 91-100, Jun 2000.
- SCHAEFFER, E.L; FIGUEIRÓ, M.; GATTAZ, W.F. Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models. **Clinics**, v. 66, p. 45-54, 2011.
- SCHAFER, Dorothy P.; STEVENS, Beth. Phagocytic glial cells: sculpting synaptic circuits in the developing nervous system. **Current opinion in neurobiology**, v. 23, n. 6, p. 1034-1040, 2013.

SCHEFF, S.; PRICE, D.; SCHMITT, F.; MUFSON, E. Hippocampal synaptic loss in early alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*, v. 27, n. 10, p. 1372–1384, 2006.

SCHULTZ, Philip *et al.* Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 397, n. 10284, p. 1577-1590, 2021.

SCHUBERT, M.; BRAZIL, D. P.; BURKS, D. J.; KUSHNER, J. A.; YE, J.; FLINT, C. L.; FARHANG-FALLAH, J.; DIKES, P.; WAROT, X. M.; RIO, C.; CORFAS, G.; WHITE, M. F. Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. **J. Neurosci.** 23, 7084-7092, 2003.

SCORZA, Carla Alessandra *et al.* Morphological and electrophysiological properties of pyramidal-like neurons in the stratum oriens of Cornu ammonis 1 and Cornu ammonis 2 area of Proechimys. **Neuroscience**, v. 177, p. 252-268, 2011.

ŚĘDZIKOWSKA, Aleksandra; SZABLEWSKI, Leszek. Insulin and insulin resistance in Alzheimer's disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 9987, 2021.

SELKOE, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiol Rev**, v. 81, n. 2, p. 741-66, Apr 2001. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333

SELKOE, D. J.; HARDY, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. **EMBO molecular medicine**, 8, pp. 595-608, 2016.

SELKOE, Dennis J. Alzheimer's disease is a synaptic failure. **Science**, v. 298, n. 5594, p. 789-791, 2002.

SEONL, Fatma Sezer *et al.* An *in vitro* and in silico approach to cholinesterase inhibitory and antioxidant effects of the methanol extract, furanocoumarin fraction, and major coumarins of *Angelica officinalis* L. fruits. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 4, p. 462-467, 2011.

SETO, Mabel *et al.* Protective genes and pathways in Alzheimer's disease: moving towards precision interventions. **Molecular Neurodegeneration**, v. 16, n. 1, p. 1-16, 2021.

SHAH, K.; DESILVA, S.; ABBRUSCATO, T. The role of glucose transporters in brain disease: diabetes and Alzheimer's Disease. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 10, p. 12629-55, Oct 03 2012.

SHAH, Murad-Ali *et al.* Chlorogenic acid alleviates cerebral ischemia-induced neuroinflammation via attenuating nuclear factor kaAPP B activation. **Neuroscience Letters**, v. 773, p. 136495, 2022.

SHAH, Sapan *et al.* Prospecting for *Cressa cretica* to treat COVID-19 via in silico molecular docking models of the SARS-CoV-2. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 40, n. 12, p. 5643-5652, 2022.

SHAKIR, Mustafa N.; DUGGER, Brittany N. Advances in deep neuropathological phenotyping of Alzheimer disease: Past, present, and future. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 81, n. 1, p. 2-15, 2022.

SHANMUGANATHAN, B.; MALAR, D. S.; SATHYA, S.; DEVI, K. P. Antiaggregation potential of padina gymnospora against the toxic Alzheimer's beta-amyloid peptide 25-35 and cholinesterase inhibitory property of its bioactive compounds. **PLoS ONE**, 10(11), e 0141708, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141708>

SHANMUGANATHAN, B.; SURYANARAYANAN, V.; SATHYA, S.; NARENKUMAR, M.; SINGH, S. K.; RUCKMANI, K.; PANDIMA DEVI, K. Anti-amyloidogenic and anti-apoptotic effect of α -bisabolol against A β induced neurotoxicity in PC12 cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 1196–1207, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.017>

SHARMA, Bhanita; PAUL, Sandip. Action of caffeine as an amyloid inhibitor in the aggregation of A β 16–22 peptides. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, n. 34, p. 9019-9033, 2016.

SHARMA, M.; GUPTA, Y. K. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. **Life Sci**, v. 68, n. 9, p. 1021-9, Jan 19 2001. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205.

SHARMA, Mohit *et al.* Design, synthesis, and structure–activity relationship of caffeine-based triazoles as dual AChE and BACE-1 inhibitors. **Drug Development Research**, 2022.

SHEELER, C.; NITSCHKE, L. Snapshot: What is the Morris Water Maze Test? **National Ataxia Foundation**. April 16, 2021.

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

SHI, Liang *et al.* Physical activity, smoking, and alcohol consumption in association with incidence of type 2 diabetes among middle-aged and elderly Chinese men. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e77919, 2013.

SHI, Min *et al.* CGA restrains the apoptosis of A β 25-35-induced hippocampal neurons. **International Journal of Neuroscience**, v. 130, n. 7, p. 700-707, 2020.

SHIMOYAMA, André T. *et al.* Antiulcerogenic activity of chlorogenic acid in different models of gastric ulcer. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 386, p. 5-14, 2013.

SHINGO, Akiko Sheala *et al.* Intracerebroventricular administration of an insulin analogue recovers STZ-induced cognitive decline in rats. **Behavioural brain research**, v. 241, p. 105-111, 2013.

SHINOHARA, Mitsuru *et al.* Regional distribution of synaptic markers and APP correlate with distinct clinicopathological features in sporadic and familial Alzheimer's disease. **Brain**, v. 137, n. 5, p. 1533-1549, 2014.

- SHIVARAMA SHETTY, M.; SAJIKUMAR, S. 'Tagging' along memories in aging: Synaptic tagging and capture mechanisms in the aged hippocampus. **Ageing Res Rev**, v. 35, p. 22-35, May 2017.
- SHOHAM, S.; BEJAR, C.; KOVALEV, E.; WEINSTOCK, M. Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats. *Exp Neurol*;184(2):1043–52, 2003.
- SHU, Y. AND CHECLER, F. Amyloid precursor protein, presenilins, and β -synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Application in Alzheimer's Disease. **Pharmacol. Rev.** v. 54, p. 469-525, 2002.
- SHULMAN, R. G. *et al.* Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. **Trends Neurosci**, v. 27, n. 8, p. 489-95, Aug 2004.
- SILVA, Bruno A *et al.* Neuroprotective effect of *H. perforatum* extracts on beta-amyloid-induced neurotoxicity. **Neurotoxicity research**. vol. 6,2, 2004.: 119-30. doi:10.1007/BF03033214
- SIMS-ROBINSON, C., HUR, J., HAYES, J.M., DAUCH, J.R., KELLER, P.J., BROOKS, S.V., FELDMAN, E.L. The role of oxidative stress in nervous system aging. *Plos. ONE* 8, e68011, 2013.
- SINGH, Amit Kumar; SINGLA, Rajeev Kumar; PANDEY, Abhay Kumar. Chlorogenic acid: A dietary phenolic acid with promising pharmacotherapeutic potential. **Current Medicinal Chemistry**, 2023.
- SINGH, N., FLETCHER, P.T., PRESTON, J.S., KING, R.D., MARRON, J.S., WEINER, M.W., JOSHI, S. Quantifying anatomical shape variations in neurological disorders. *Med. Image Anal.* 18, 616–633, 2014.
- SINGH, Saumitra Sen *et al.* Neuroprotective effect of chlorogenic acid on mitochondrial dysfunction-mediated apoptotic death of DA neurons in a Parkinsonian mouse model. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2020, 2020
- SINYOR, Benjamin; MINEO, Jocelyn; OCHNER, Christopher. Alzheimer's disease, inflammation, and the role of antioxidants. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, v. 4, n. 1, p. 175-183, 2020.
- SKAPER, Stephen D. The brain as a target for inflammatory processes and neuroprotective strategies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1122, n. 1, p. 23-34, 2007.
- SMITH, Andrew. Effects of caffeine on human behavior. **Food and chemical toxicology**, v. 40, n. 9, p. 1243-1255, 2002.
- SONG, Y. L. *et al.* Study on phenolic acids and their anti-inflammatory activities in *Lonicera japonica*. **Chinese herbal medicine**, v. 46, n. 4, p. 490-495, 2015.
- SONKUSARE, S. *et al.* Effect of donepezil and lercanidipine on memory impairment induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. **Life Sci**, v. 77, n. 1, p. 1-14,. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205, May 20 2005.

- 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**, 390(6), 581–593, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00210-017-1357-4>
- SOUKHAKLARI, Roksana *et al.* The passive avoidance memory improving effect of curcumin in young adult mice: Considering hippocampal MMP-2, MMP-9 and Akt/GSK3 β . **PharmaNutrition**, v. 6, n. 3, p. 95-99, 2018.
- SPENCER, J.P.E. Flavonoids: modulators of brain function? **British Journal of Nutrition**, v. 99, p. ES60–E, 2008.
- SPIRES, T. L.; & HYMAN, B. T. Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. **NeuroRx** 2, 423-37, 2005.
- SPIRES-JONES, T. L.; HYMAN, B. T. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in alzheimer's disease. **NEURON**, 82, PP. 756-77, 2014.
- SQUIRE, L. R.; ZOLA, S. M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 26, n. 93, p. 13515-22, 1996.
- SRIVASTAVA, Sukriti; AHMAD, Razi; KHARE, Sunil Kumar. Alzheimer's disease and its treatment by different approaches: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 216, p. 113320, 2021.
- STEEN, E. *et al.* Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? **J Alzheimers Dis**, v. 7, n. 1, p. 63-80, Feb 2005.
- STEFANELLO, Naiara *et al.* Coffee, caffeine, chlorogenic acid, and the purinergic system. **Food and Chemical Toxicology**, v. 123, p. 298-313, 2019.
- STEFANELLO, Naiara *et al.* **Efeito do ácido clorogênico, cafeína e café nas alterações oxidativas e no sistema purinérgico de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.** 2016. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.
- STEFANELLO, Naiara *et al.* Effects of chlorogenic acid, caffeine, and coffee on behavioral and biochemical parameters of diabetic rats. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 388, p. 277-286, 2014.
- STENCE, Nick; WAITE, Marc; DAILEY, Michael E. Dynamics of microglial activation: A confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. **Glia**, v. 33, n. 3, p. 256-266, 2001.
- STÖHR, Oliver *et al.* Insulin receptor signaling mediates APP processing and β -amyloid accumulation without altering survival in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Age**, v. 35, p. 83-101, 2013.
- SUÁREZ-PEREIRA, I.; CANALS, S.; CARRIÓN, Á. M. Adult newborn neurons are involved in learning acquisition and long-term memory formation: The distinct demands on temporal neurogenesis of different cognitive tasks. **Hippocampus**, v. 25, n. 1, p. 51–61, 2015.
- SULTANA, R.; BAGLIONI, M.; CECCHETTI, R.; CAI, J.; KLEIN, J. B.; BASTIANI, P.; RUGGIERO, C.; MECOCCHI, P.; BUTTERFIELD, D. A. Lymphocyte mitochondria: toward

identification of peripheral biomarkers in the progression of Alzheimer disease. **Free Radic. Biol. Med.** 65, 595–606, 2013.

SUN, X.; CHEN, W. D.; & WANG, Y. D. β -Amyloid: The key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Frontiers in Pharmacology**, 6(SEP), 1–9, 2015.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00221>

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.

SUZUKI, N. *et al.* High tissue content of soluble beta 1-40 is linked to cerebral amyloid angiopathy. **Am J Pathol**, v. 145, n. 2, p. 452-60, Aug 1994.

SWARDFAGER, W. *et al.* A Meta-Analysis of Cytokines in Alzheimer's Disease. **Biological Psychiatry**, v. 68, n. 10, p. 930–941, nov. 2010.

SZCZECHOWIAK, Katarzyna; DINIZ, Breno S.; LESZEK, Jerzy. Diet and Alzheimer's dementia–Nutritional approach to modulate inflammation. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 184, p. 172743, 2019.

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. ISSN 0862-8408 (Print) 0862-8408

SZUTOWICZ, A.; BIELARCZYK, H.; JANKOWSKA-KULAWY, A.; PAWELCZYK, T.; ROONWSKA, A. Acetyl-coa the key factor for survival or death of cholinergic neurons in course of neurodegenerative diseases. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 8, p. 1523–1542, 2013.

SZWAJGIER, Dominik. Anticholinesterase activity of phenolic acids and their derivatives. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 68, n. 3-4, p. 125-132, 2013.

TABAK, A.G.; HERDER, C.; RATHMANN, W.; BRUNNER, E. J.; KIVIMAKI, M. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. **Lancet** 379, 2279 e 2290, 2012.

TAJIK, Narges *et al.* The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. **European journal of nutrition**, v. 56, p. 2215-2244, 2017.

TAKAHASHI, Keita *et al.* Coffee consumption in aged mice increases energy production and decreases hepatic mTOR levels. **Nutrition**, v. 38, p. 1-8, 2017.

TAKEDA, S.; SATO, N.; RAKUGI, H.; MORISHITA, R. Molecular mechanisms linking diabetes mellitus and Alzheimer disease: beta-amyloid peptide, insulin signaling, and neuronal function. **Mol BioSyst** 7:1822–1827, 2011.

TAKEHARA-NISHIUCHI, K. Neurobiology of systems memory consolidation. **European Journal of Neuroscience**, v. 54, n. 8, p. 6850–6863, 25 out. 2021.

TAMAKOSHI, Akiko *et al.* Effect of coffee consumption on all-cause and total cancer mortality: findings from the JACC study. **European journal of epidemiology**, v. 26, p. 285-293, 2011.

TANSKANEN, A. *et al.* Heavy coffee drinking and the risk of suicide. **European journal of epidemiology**, v. 16, p. 789-791, 2000.

TAPIA-ARANCIBIA, L. *et al.* New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. **Brain Research Reviews**, v. 59, n. 1, p. 201–220, 2008.

TARAM, Faten; WINTER, Aimee N.; LINSEMAN, Daniel A. Neuroprotection comparison of chlorogenic acid and its metabolites against mechanistically distinct cell death-inducing agents in cultured cerebellar granule neurons. **Brain Research**, v. 1648, p. 69-80, 2016.

TRAMUTOLA, Antonella *et al.* Brain insulin resistance triggers early onset alzheimer disease in Down syndrome. **Neurobiology of Disease**, v. 137, p. 104772, 2020.

TEISSEIRE, P. J. Chemistry of Fragrant Substances (Translated by Cadby, P.A. VCH Publishers, New York, 1994.

TEIXEIRA, Janaína Espinosa. Neuroproteção por cafeína em modelo animal de Doença de Alzheimer. 2015.

TEJEDA, Gonzalo S.; DÍAZ-GUERRA, Margarita. 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, 2017.

TERRY, R. D.; MASLIAH, E.; SALMON, D. P.; BUTTERS, N.; DETERESA, R.; HILL, R.; HANSEN, L. A.; AND KATZMAN, R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. **Ann Neurol** 30, 572-80, 1991.

TERWEL, Dirk *et al.* Brain enzyme activities after intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats receiving acetyl-L-carnitine. **European journal of pharmacology**, v. 287, n. 1, p. 65-71, 1995.

THOM, E. The Effect of Chlorogenic Acid Enriched Coffee on Glucose Absorption in Healthy Volunteers and Its Effect on Body Mass When Used Long-term in Overweight and Obese People. **Journal of International Medical Research**. v. 35, p. 900-908, 2007.

THORENS, B. Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion. **Diabetes Obes Metab** 13(Suppl 1): 82–88, 2011.

TIWARI, Virendra *et al.* Protriptyline improves spatial memory and reduces oxidative damage by regulating NFκB-BDNF/CREB signaling axis in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. **Brain Research**, v. 1754, p. 147261, 2021.

TIWARI, Virendra *et al.* Caffeine improves memory and cognition via modulating neural progenitor cell survival and decreasing oxidative stress in Alzheimer's rat model. **Current Alzheimer Research**, 2023.

TOEPPER, M. Dissociating normal aging from Alzheimer's disease: A view from cognitive neuroscience. **Journal of Alzheimer's disease**, 57(2), 331-352. 2017.

TORRES, Pedro HM *et al.* Key topics in molecular docking for drug design. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4574, 2019.

TOTA, S.; KAMAT, P.; SHUKLA, R.; NATH, C. Improvement of brain energy metabolism and cholinergic functions contributes to the beneficial effects of silibinin against streptozotocin induced memory impairment. *Behavioural Brain Research*, v. 221, p. 207–215, 2011.

TOTA, Santoshkumar *et al.* Candesartan improves memory decline in mice: involvement of AT1 receptors in memory deficit induced by intracerebral streptozotocin. **Behavioural brain research**, v. 199, n. 2, p. 235-240, 2009.

TROTT, O.; OLSON, A. J. Software news and update AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function. **Effic. Optim. Multithreading**, v. 31, p. 455-461, 2009.

ULLAH, Faheem *et al.* Caffeine prevents d-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain. **Neurochemistry international**, v. 90, p. 114-124, 2015.

UNITED NATIONS DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS, POPULATION DIVISION. World population prospects 2022: Summary of results. 2022.

VAN DAM, Rob M.; HU, Frank B.; WILLETT, Walter C. Coffee, caffeine, and health. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 4, p. 369-378, 2020.

VAN DYCK, Christopher H. *et al.* Lecanemab in early Alzheimer's disease. **New England Journal of Medicine**, v. 388, n. 1, p. 9-21, 2023.

VAN GELDER, B. M. *et al.* Coffee consumption is inversely associated with cognitive decline in elderly European men: the FINE Study. **European journal of clinical nutrition**, v. 61, n. 2, p. 226-232, 2007.

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.

VENDITTI, Alessandro *et al.* Essential oil composition, polar compounds, glandular trichomes and biological activity of *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman from central Italy. **Industrial crops and products**, v. 77, p. 353-363, 2015.

VERRET, L.; MANN, E.; HANG, G.; BARTH, A.; COBOS, I.; HO, K.; DEVIDZE, N.; MASLIAH, E.; KREITZER, A.; MODY, I.; MUCKE, L.; PALOP, J. Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in alzheimer model. *Cell*, v. 149, n. 3, p. 708–721, 2012.

VILLEMAGNE, V. L. *et al.* Abeta-amyloid and Tau Imaging in Dementia. **Semin Nucl Med**, v. 47, n. 1, p. 75-88, Jan 2017.

VRHOVSEK, U. *et al.* Fate of microbial metabolites of dietary polyphenols in rats: is the brain their target destination?. In: **Food to life: 4th International Conference on Foodomics, Cesena, Italy, 8-9 October 2015**. Università degli studi di Bologna, p. 106-107. 2015.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2:322-328, 2007.

- WALSH, D. M.; KLYUBIN, I.; FADEEVA, J. V.; CULLEN, W.K.; ANWYL, R.; WOLFE, M. S.; ROWAN, M. J.; SELKOE, D. J. Naturally secreted oligomers of amyloid b protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo, **Nature**. 416, 535 e 539, 2002.
- WANG, Jun *et al.* Grape-derived polyphenolics prevent A β oligomerization and attenuate cognitive deterioration in a mouse model of Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 25, p. 6388-6392, 2008.
- WANG, Qiuming *et al.* Inhibition of amyloid- β aggregation in Alzheimer's disease. **Current pharmaceutical design**, v. 20, n. 8, p. 1223-1243, 2014.
- WANG, Shao-Nan *et al.* Discovery and proteomics analysis of effective compounds in Valeriana jatamansi jones for the treatment of anxiety. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 265, p. 113452, 2021.
- WANG, X.; ZHENG, W.; XIE, J-W.; WANG, T.; WANG, S-L.; TENG, W-P.; WANG, Z-Y. Insulin deficiency exacerbates cerebral amyloidosis and behavioral deficits in an Alzheimer transgenic mouse model. **Mol Neurodegener** 5:46, 2010b.
- WARDHANI, R. *et al.* Utilization of Nypa fruit in Alzheimer's Disease: An In Silico Approach. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, 2019. p. 022003.
- WATERHOUSE, Andrew *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic acids research**, v. 46, n. W1, p. W296-W303, 2018.
- WATSON, G. S.; CRAFT, S. The role of insulin resistance in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for treatment. **CNS Drugs** 17, 27 e 45, 2003.
- WEDICK, Nicole M. *et al.* Effects of caffeinated and decaffeinated coffee on biological risk factors for type 2 diabetes: a randomized controlled trial. **Nutrition journal**, v. 10, p. 1-9, 2011.
- WEI, Menglin *et al.* Protective effects of a Chotosan Fraction and its active components on β -amyloid-induced neurotoxicity. **Neuroscience Letters**, v. 617, p. 143-149, 2016.
- WEI, Z.; KOYA, J.; REZNIK, S. E. Insulin Resistance Exacerbates Alzheimer Disease via Multiple Mechanisms. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, 19 jul. 2021.
- WEINSTEIN, Galit *et al.* Serum brain-derived neurotrophic factor and the risk for dementia: the Framingham Heart Study. **JAMA neurology**, v. 71, n. 1, p. 55-61, 2014.
- 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, p. 347-366, 2004.
- WILLETTE, A. A.; XU, G.; JOHNSON, S. C.; BIRDSILL, A. C.; JONAITIS, E. M. Insulin resistance, brain atrophy and cognitive performance in late middle-aged adults. **Diabetes Care** 36:443-449, 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.

WINERDAL, Max *et al.* Single dose caffeine protects the neonatal mouse brain against hypoxia ischemia. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0170545, 2017.

WIN-SHWE, Tin-Tin *et al.* Impairment of novel object recognition in adulthood after neonatal exposure to diazinon. **Archives of toxicology**, v. 87, p. 753-762, 2013.

WINTERS, B. D.; SAKSIDA, L. M.; BUSSEY, T. J. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. **Neurosci. Biobehav.**, v. 32, p. 1055–1070, 2008.

WIRZ, K.T.; KEITEL, S.; SWAAB, D.F.; VERHAAGEN, J.; BOSSERS, K. Early molecular changes in Alzheimer disease: can we catch the disease in its presymptomatic phase? **J Alzheimer's Dis.** 38 (4), 719–740, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Background Paper 6.11 Alzheimer Disease and other Dementias (Duthey B, ed). **World Health Organization**, 2013.

WU, J.; LI, H.; SUN, X.; ZHANG, H.; HAO, S.; JI, M.; YANG, J.; LI, K. A mitochondrion-targeted antioxidant ameliorates isoflurane-induced cognitive deficits in aging mice. **PLoS One**, 10:e0138256, 2015.

WU, Yuwen *et al.* Microglia: dynamic mediators of synapse development and plasticity. **Trends in immunology**, v. 36, n. 10, p. 605-613, 2015.

WU, Zhimin *et al.* Improvement of obesity by Liupao tea is through the IRS-1/PI3K/AKT/GLUT4 signaling pathway according to network pharmacology and experimental verification. **Phytomedicine**, v. 110, p. 154633, 2023.

XIA, Jiadong *et al.* An up-to-date meta-analysis of coffee consumption and risk of prostate cancer. **Urology Journal**, v. 14, n. 5, p. 4079-4088, 2017.

XIE, H.; HOU, S.; JIANG, J.; SEKUTOWICZ, M.; KELLY, J.; BACSKAI, B. J. Rapid cell death is preceded by amyloid plaque-mediated oxidative stress. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 7, p. 7904- 7909, 2013.

XIE, Junhua; VAN HOECKE, Lien; VANDENBROUCKE, Roosmarijn E. The impact of systemic inflammation on Alzheimer's disease pathology. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 5731, 2022.

XU, Kui *et al.* Neuroprotection by caffeine in the MPTP model of parkinson's disease and its dependence on adenosine A2A receptors. **Neuroscience**, v. 322, p. 129-137, 2016.

XU, Z.P., LI, L., BAO, J., WANG, Z.H., ZENG, J., LIU, E.J., LI, X.G., HUANG, R.X., GAO, D., LI, M.Z., ZHANG, Y., LIU, G.P., WANG, J.Z., Magnesium protects cognitive functions and synaptic plasticity in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's model. **PLoS One**. 9 (9), e108645., 2014.

Y.-N. *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates endotoxin-induced production of inflammatory mediators by inhibiting MAPK activation in primary cortical neuron-glia cultures. **Journal of neuroinflammation**, v. 12, n. 1, 12 ago. 2015.

YAN, C.; ZOU, X. Modeling Protein Flexibility in Molecular Docking. **Comprehensive Medicinal Chemistry III**. In: Elsevier, Cap 3.13, p. 319-328, 2017.

YANG, Licong; WANG, Na; ZHENG, Guodong. Enhanced effect of combining chlorogenic acid on selenium nanoparticles in inhibiting amyloid β aggregation and reactive oxygen species formation *in vitro*. **Nanoscale Research Letters**, v. 13, p. 1-9, 2018.

YING, S.; JIN, C.; SONG, Z.; YU, X.; XIAO, C.; YU, H.; ... ZHANG, H. Intracerebroventricular streptozotocin - induced Alzheimer ' s disease - like sleep disorders in rats : Role of the GABAergic system in the parabrachial complex, (June), 1–12, 2018. <https://doi.org/10.1111/cns.13032>

YU, Liqun *et al.* Uncovering multiple molecular targets for caffeine using a drug target validation strategy combining A2A receptor knockout mice with microarray profiling. **Physiological genomics**, v. 37, n. 3, p. 199-210, 2009.

ZEISEL, John; BENNETT, Kirsty; FLEMING, Richard. World Alzheimer Report 2020: Design, dignity, dementia: Dementia-related design and the built environment. 2020.

ZHANG, L.; LI, Z. Alzheimer and the discovery of Alzheimer's disease. **Zhonghua Yi Shi Za Zhi**, 2014.

ZHANG, Lun-Yi *et al.* Effect of chlorogenic acid on hydroxyl radical. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 247, p. 205-210, 2003.

ZHANG, W.; WANG, G. M.; WANG, P. J.; ZHANG, Q.; SHA, S. H. Effects of neural stem cells on synaptic proteins and memory in a mouse model of Alzheimer's disease. **J Neurosci Res**, v. 92, n. 2, p. 185-94, Feb 2014.

ZHANG, X.-X. *et al.* The epidemiology of Alzheimer's disease modifiable risk factors and prevention. **The journal of prevention of Alzheimer's disease**, v. 8, p. 313-321, 2021.

ZHAO, Hui-Ling *et al.* Prophylactic effects of sporoderm-removed *Ganoderma lucidum* spores in a rat model of streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 269, p. 113725, 2021.

ZHAO, Y.; ZHAO, B. Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2013, p. 316523, 2013.

ZHAO, Z. A. *et al.* Adenosine A2A receptor inactivation alleviates early-onset cognitive dysfunction after traumatic brain injury involving an inhibition of tau hyperphosphorylation. **Translational psychiatry**, v. 7, n. 5, p. e1123-e1123, 2017.

ZHI-KUN, S.; HONG-QI, Y.; ZHI-QUAN, W.; JING, P.; ZHEN, H.; SHENG-DI, C. Current advances in the treatment of Alzheimer's disease: focused on considerations targeting Ab and tau, **Transl. Neurodegener.** 1, 21, 2012.

ZHOU, Xiangyu; ZHANG, Lin. The neuroprotective effects of moderate and regular caffeine consumption in Alzheimer's disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2021, 2021.

ZILKA, N.; FERENCIK, M.; HULIN, I. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: protector or promoter? **Bratislavske lekarske listy**, v. 107, n. 9-10, p. 374-383, 2006.

ZILKENS, R. R. *et al.* Clinical epidemiology and in-patient hospital use in the last year of life (1990-2005) of 29,884 Western Australians with dementia. **J Alzheimers Dis**, v. 17, n. 2, p. 399-407, 2009. ISSN 1387-2877.

ANEXO



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO CAFÉ, CAFEINA E ÁCIDO CLOROGÊNICO EM UM MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE ALZHEIMER INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA", protocolada sob o CEUA nº 8904290319 (ID 000948), sob a responsabilidade de **Geanne Matos de Andrade e equipe; Jéssica Rabelo Bezerra** - 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 16/04/2019.

We certify that the proposal "STUDY OF THE NEUROPROTETIC EFFECT OF COFFEE, CAFFEINE AND CHLOROGENIC ACID IN AN ANIMAL MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE INDUCED BY ESTREPTOZOTOCIN", utilizing 240 Heterogenics mice (240 males), protocol number CEUA 8904290319 (ID 000948), under the responsibility of **Geanne Matos de Andrade and team; Jéssica Rabelo Bezerra** - 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 04/16/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **04/2019** a **03/2023**

Área: **Departamento de Fisiologia E Farmacologia**

Origem: **Biotério Central da UFC**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **4 a 6 semanas**

N: **240**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **25 a 35 g**

Local do experimento: Todas as etapas experimentais (tratamento e comportamento) serão feitas no biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos(NPDM-UFC), com exceção das análises bioquímicas e histológicas, que serão realizadas no Laboratório de Neurociência e Comportamento. No entanto, essa fase é realizada após a eutanásia.

Fortaleza, 16 de abril de 2019

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Camila Ferreira Roncari
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará