



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O CONSUMO DE
ANTOCIANINAS E A PREVENÇÃO DE ALTERAÇÕES
COGNITIVAS, NEUROQUÍMICAS E
INFLAMATÓRIAS NOS MODELOS EXPERIMENTAIS
DE DESMIELINIZAÇÃO E DE NEUROINFLAMAÇÃO
EM ROEDORES**

TESE DE DOUTORADO

Fabiano Barbosa Carvalho

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O CONSUMO DE ANTOCIANINAS E
A PREVENÇÃO DE ALTERAÇÕES COGNITIVAS,
NEUROQUÍMICAS E INFLAMATÓRIAS NOS MODELOS
EXPERIMENTAIS DE DESMIELINIZAÇÃO E DE
NEUROINFLAMAÇÃO EM ROEDORES**

Fabiano Barbosa Carvalho

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica do Centro de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Orientadora: Cinthia Melazzo de Andrade
Co-orientador: Jessié Martins Gutierrez

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Carvalho, Fabiano Barbosa

Associação entre o consumo de antocianinas e a prevenção de alterações cognitivas, neuroquímicas e inflamatórias nos modelos experimentais de desmielinização e de neuroinflamação em roedores / Carvalho, Fabiano Barbosa.-2015.

165 p.; 30cm

Orientadora: Cinthia Melazzo de Andrade

Coorientador: Jessié Martins Gutierres

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2015.

1. Desmielinização 2. Neuroinflamação 3. Antocianinas 4. Bombas iônicas 5. Estresse oxidativo 6. Roedores. I. Andrade, Cinthia Melazzo de II. Gutierres, Jessié Martins III. Título.

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Fabiano Barbosa Carvalho. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: fabiseco@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O CONSUMO DE ANTOCIANINAS E A
PREVENÇÃO DE ALTERAÇÕES COGNITIVAS,
NEUROQUÍMICAS E INFLAMATÓRIAS NOS MODELOS
EXPERIMENTAIS DE DESMIELINIZAÇÃO E DE
NEUROINFLAMAÇÃO EM ROEDORES**

elaborada por

Fabiano Barbosa Carvalho

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

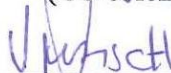
COMISSÃO EXAMINADORA:



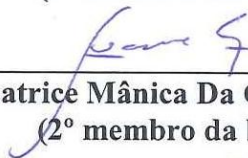
**Cinthia Melazzo de Andrade, Dr^a
(Presidente/ Orientadora)**



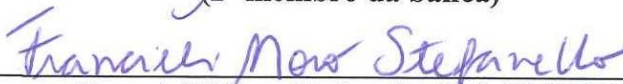
**Jessié Martins Gutierrez, Dr^a
(Co-orientador)**



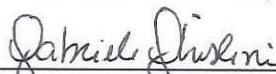
**Vera Maria Melchiors Morsch, Dr^a (UFSM)
(1º membro da banca)**



**Ivana Beatrice Mânica Da Cruz, Dr^a (UFSM)
(2º membro da banca)**



**Francieli Moro Stefanello, Dr^a (UFPEL)
(3º membro da banca)**



**Gabriele Cordenonzi Ghisleni Dr^a (UCPEL)
(4º membro da banca)**

Santa Maria, 14 de agosto de 2015

*À minha família e aos meus amigos: obrigado pelo carinho, atenção e
motivação. Dedico à vocês mais esta vitória que alcanço.*

AGRADECIMENTOS

Aqui se compõe uma das partes mais importantes da minha tese. Sem discussões científicas, gráficos complexos e citações de grandes obras. Nesta seção tenho a liberdade de escrever, em primeira pessoa, e destacar aqueles que foram fundamentais para o desenvolvimento e conclusão do meu doutoramento. Poucos amigos e familiares conseguirão compreender a importância destes anos de doutoramento e o que os artigos que escrevi podem representar. Mas se um dia forem ler a minha tese, certamente esta será a primeira página buscada. À essas pessoas tão amadas, leigas na ciência que faço mas peritas na essência que sou, deixo os meus agradecimentos. Vocês não fazem parte dos co-autores em minhas obras, tão pouco foram a minha referência bibliográfica. Mas vocês me deram a força e energia que precisei para superar meus obstáculos e atingir a realização do meu sonho em ser doutor.

Para dar início, primeiro agradeço a Deus, Jesus Cristo e Espírito Santo! A Santíssima Trindade sou eternamente grato por esta realização. E faço questão de citar um trecho de uma música escrita por Frederico Cruz e cantada pelo Padre Fábio de Melo: “...tudo é do pai toda honra e toda glória. É dele a vitória alcançada em minha vida. Tudo é do pai, se sou fraco e pecador bem mais forte é o meu senhor que me cura por amor.” Obrigado por serem confidentes das minhas perdas e frustrações. Obrigado por acalmar o meu espírito e por me fortalecer diante de cada obstáculo. Peço que guiem os meus passos por um caminho ético e digno, e que, de alguma forma, todos os meus esforços e fruto do meu trabalho possam contribuir positivamente na vida do próximo.

Aos meus pais Ricardo e Gicelia, meu reconhecimento não se limita apenas as minhas vitórias profissionais. Meus pais são um grande exemplo de vida, o qual sempre me espelharei. Vocês formaram meu caráter, moldaram a minha personalidade e me prepararam para enfrentar todas as dificuldades da vida com muita fé e perseverança. Agradeço por abrirem mão de seus sonhos para que pudessem realizar o meu.

Além dos meus pais, sigo meus agradecimentos a outros membros importantes na minha família. Às minhas avós, agradeço por enfocarem a importância da educação para a vida. Obrigado vó Lany e vó Célia pelo amor incondicional, pela amizade e por todas as palavras de sabedoria. Vocês fazem parte de cada vitória que alcanço. Um grande beijo do eterno netinho.

No meu ambiente profissional primeiramente destaco minha orientadora Cinthia Andrade. Obrigado por todo conhecimento ofertado, pela confiança depositada e pela

amizade. Através desse relacionamento profissional e dessa amizade pude evoluir e aprender muito sobre a importância de pensar positivo, de acreditar no meu potencial e de correr atrás dos meus sonhos. Que nossa amizade continue para além desta etapa, e que possamos compartilhar muitos momentos de risos e alegrias acompanhado de uma boa cerveja e de grandes amigos. Ao meu co-orientador e melhor amigo, Jessié Gutierres, palavras são pouco para agradecer neste momento. Eu destaco o grande aprendizado que tive convivendo contigo. Nossa parceria foi fundamental para minha formação científica. Desde a bancada até a redação de um manuscrito pude contar com teu apoio. Obrigado por ser meu grande amigo e meu mestre, e por saber equilibrar ambas as funções com responsabilidade e tanta dedicação. Espero ter a oportunidade de seguir trabalhando ao teu lado.

O sonho de atingir o grau de doutor não ocorreu ao acaso. Muitas das minhas escolhas foram baseadas com a convivência de grandes mestres no meio acadêmico. Obtive o grau de biomédico pela Universidade de Cruz Alta. Lá fiz amizades que foram marcantes, tanto com o corpo discente quanto com o corpo docente. Em relação a esta fase da minha vida, meu primeiro “obrigado” é dedicado a minha professora e amiga Patrícia Marisco. Pati, enfim chegou o grande dia!!! Na elaboração do meu primeiro resumo para um congresso, na preparação da minha primeira solução e na execução da minha primeira experiência científica, você estava lá. Obrigado por todos esses ensinamentos e por ter sido uma grande mestra! Um grande abraço do amigo.

Outra grande mestra a quem tenho muito a agradecer é a Prof. Caroline Rizzi. Sempre gostei muito de todas as disciplinas das áreas biomédicas. Mas, como tudo na vida, um dia temos de fazer nossas escolhas. Você fez da bioquímica, uma das disciplinas mais temidas pelos alunos, a melhor. Agradeço pelas aulas maravilhosas, pela nossa amizade e companheirismo. Aquele abraço bem apertado!

Em contrapartida, não são somente os nossos mestres que nos proporcionaram um belo aprendizado. Dedico parte desta obra a Crystiane Bohnert, aluna de iniciação científica que me acessorou nesta tese. Crys foi uma pesquisadora dedicada e correta. Fazia tudo com tamanha perfeição que me impressionava. Minuciosa e detalhista. Você foi meu braço direito na bancada. Sempre te admirei e aprendi muito sobre coleguismo e amizade. Obrigado Crys!

Aos demais amigos e companheiros de bancada agradeço ao Juliano Vieira, a Marília Rodrigues, Heloisa Heinloft, Cássia da Silva, Fran Pain, Pati Wolkmer, Graciane Aiello, Cibele Lhamas, Pâmela Fruhauf e Lenise Pompeo pelo auxílio no desenvolvimento das minhas experiências. Um abraço especial a Rosmarini, grande médica veterinária, que me ajudou a padronizar os primeiros protocolos e organizar o Bio-Ox. Tralhamos pouco tempo

juntos mas foi um prazer ter sua companhia e amizade. Andressa Bueno, em especial, sempre ao meu lado me ajudando a resolver inúmeros problemas. Você é uma grande amiga e excelente profissional que tem minha admiração e amizade. Depois de um dia cansativo, nada melhor que a sua companhia, a do meu amigo Segala e da Bhasca acompanhado de um belo carreteiro ou churrasco “louco de especial”. Esses momentos entre amigos que fazem a vida valer a pena. Obrigado meus queridos por fazerem os meus dias melhores!

Minhas irmãs de coração Adriana e Simone, muito obrigado. Durante minha estadia em Santa Maria conheci pessoas maravilhosas e vocês foram um achado muito importante pra minha vida. Que nossa amizade perdure muitos e muitos anos, e que possamos sempre compartilhar das nossas jantas e momentos de descontração. Que eu possa retribuir um dia toda a ajuda e todo o carinho que vocês me oferecem com tanta alegria e disposição.

Agradeço ao grupo LabNeuro, as pesquisadoras Dr^a Maribel Rubin e Dr^a Sara Marchesan, aos seus alunos pesquisadores pela amizade e pelas colaborações que continuaram ocorrendo mesmo com a minha saída do grupo. Agradeço também ao grupo EnzitoX, as pesquisadoras Dr^a Maria Rosa Schetinger e Dr^a Vera Maria Morsch, e aos seus alunos pesquisadores, pelo apoio ao nosso grupo de pesquisa e pela amizade. Obrigado Dr^a Rosélia Spanevello. Você é uma grande amiga e sempre pude contar com a sua ajuda e atenção. Você é um exemplo enquanto pessoa e pesquisador e nunca negou um auxílio para o desenvolvimento das minhas experiências. Obrigado por tudo Rose!

Durante o doutoramento, fiz a escolha de realizar uma parte dos estudos no exterior. Durante este período fui acolhido pelo Laboratório de Sinapses Glutamatérgicas do Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC) da Universidade de Coimbra. Não há como medir nem descrever o aprendizado que essa convivência me permitiu. Desta forma, a CAPES e ao programa PDSE deixo meu eterno agradecimento e faço questão de dizer o quanto esse programa pode transformar a vida de um pesquisador em formação. Muito obrigado pela bolsa e por esta oportunidade única. Espero que esse programa contemple muitos outros alunos.

Obrigado ao CNC e a Universidade de Coimbra. Obrigado prof. Dr^a Ana Luisa Carvalho! Apesar da breve estadia e do pouco convívio sou grato por todo conhecimento transmitido, pela paciência diante das minhas dificuldades e limitações, e por confiar no meu trabalho. Aprendi muito sob sua orientação e saiba que lhe admiro muito como pessoa e pesquisadora. Obrigado também prof. Dr. Carlos Duarte e seus alunos pela recepção e por contribuírem na execução do meu estágio doutoral. Deixo um abraço bem apertado a Sandrinha, Susy Louros, Mariline, Jeanete, Luís Ribeiro, Carlos, Joana Fernandes e Marta

Vieira. Ao grupo da Sala dos “Fixe”, um abraço para Sara Varela, Lara Franco, Susana Sampaio, Ana Teresa, Filipa, Michele, Luís Martins e Helena; muito obrigado pela amizade e pela companhia pelos bares e nas noites de filme. Vocês me ajudaram muito a superar a saudade do Brasil. Ao meus quase irmãos Pedro Alves e Gladys Caldeira, eu agradeço pela enorme paciência e auxílio nas experiências. Também destaco a amizade que criamos pelo convívio diário. Admiro vocês imensamente e não vejo a hora de revê-los em breve. À Miranda Mele, uma excepcional pesquisadora, obrigado por me ensinar tanto com paciência e dedicação, certamente você será uma grande professora. A minha eterna queridinha Tatianita, um abraço do amigo brazuca que ficou devendo muitos brigadeiros! Aos meus anjos da guarda no CNC, as técnicas Dona Céu e Elisabete muito obrigado pelo carinho e palavras sábias nos momentos de saudade da minha família. Um beijão!

Aos professores da banca, muito obrigado pela disponibilidade e pelas contribuições na correção da minha tese!

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica sou muito grato pela possibilidade de realizar este curso. Aqui além de todo conhecimento que obtive, tive a oportunidade de conhecer professores incríveis, pessoas fascinantes e, evidentemente, os amigos que fiz e levarei comigo por toda a vida. A UFSM e a Bioquímica Toxicológica sempre farão parte da minha vida. Aqui aprendi a importância da ciência e da pesquisa científica e também que, embora com pouco recurso mas muita dedicação, podemos fazer trabalhos de qualidade e contribuir ao mundo científico. Muito obrigado!

À CAPES deixo meu agradecimento pela bolsa de doutoramento e pelos recursos financeiros concedidos.

Ao CNPq muito obrigado pelos recursos para o desenvolvimento desta pesquisa.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Qualquer homem pode alcançar o êxito, se dirigir seus pensamentos numa direção e insistir neles até que aconteça alguma coisa. Aprenda a confiar em si mesmo e aprenderá o grande segredo da vida”.

(Thomas Edison)

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

ASSOCIAÇÃO ENTRE O CONSUMO DE ANTOCIANINAS E A PREVENÇÃO DE ALTERAÇÕES COGNITIVAS, NEUROQUÍMICAS E INFLAMATÓRIAS NOS MODELOS EXPERIMENTAIS DE DESMIELINIZAÇÃO E DE NEUROINFLAMAÇÃO EM ROEDORES

AUTOR: FABIANO BARBOSA CARVALHO

ORIENTADORA: CINTHIA MELAZZO DE ANDRADE

CO-ORIENTADOR: JESSIÉ MARTINS GUTIERRES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 14 de agosto de 2015.

As antocianinas (ANT) são fitonutrientes com propriedades antioxidantes e neuroprotetoras. Neste contexto, este estudo buscou evidências de um possível efeito protetor das ANT em modelos de neuroinflamação e desmielinização em roedores. Ratos foram submetidos a desmielinização experimental pela administração de brometo de etídio (BE, 0,1% em salina, 10 µL) intra-pontine. Além disso um experimento *in vitro* foi conduzido para verificar se as ANT (1-100 µg/mL) são capazes de reduzir o estresse oxidativo e nitrosativo na ponte de ratos expostos a peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 4 mM) e nitroprussiato de sódio (NPS, 1 mM). Camundongos C57BL6 foram submetidos a neuroinflamação pela administração aguda de lipopolissacarídeo (LPS 250 µg/kg, 5 mL/kg, em salina) intraperitonealmente. As doses de ANT para ambos os protocolos foram de 30 e 100 mg/kg (via oral, gavagem, em salina). As ANT foram capazes de neutralizar as espécies reativas induzidas pelo H₂O₂ e pelo NPS reduzindo o conteúdo de malondialdeído, proteína carbonil e nitritos e nitratos (NO_x). Em relação ao modelo de desmielinização tóxica, as ANT provenientes da casca da uva foram administradas durante 7 dias a partir da injeção de BE. No sétimo dia os animais foram submetidos a eutanásia. Pode-se observar um efeito protetor das ANT sobre o aumento nos marcadores de estresse oxidativo: malondialdeído, proteína carbonil e NO_x. ANT protegeram também a redução na atividade da enzima superóxido dismutase e no conteúdo de tióis não proteicos e glutathiona reduzida. Uma correlação negativa mostrou um aumento nos marcadores de estresse oxidativo e uma redução na atividade das enzimas Na⁺,K⁺-ATPase e Ca²⁺-ATPase. As ANT restabeleceram a atividade das bombas iônicas. As ANT também reduziram o aumento de interleucinas (IL)-1β, IL-6, fator de necrose tumoral (TNF)-α e interferon (INF)-γ induzidos pelo BE. As ANT suprimiram o infiltrado inflamatório local, a presença de neutrófilos e reduziram a área de desmielinização. Em relação ao modelo de neuroinflamação, o pré-tratamento durante dez dias com ANT provenientes do mirtilo preveniram a piora na memória induzido pelo LPS administrado pós-treino. ANT preveniram também o aumento do conteúdo de malondialdeído, proteína carbonil e NO_x no córtex cerebral e no hipocampo 4 e 24 horas pós-administração de LPS. ANT não mostraram efeito protetor sobre a redução na atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase, mas foram capazes de suprimir o processo inflamatório e a presença de neutrófilos, bem como a imunoreatividade microglial para CD11b no hipocampo 24 horas pós administração de LPS. A desmielinização e a neuroinflamação não foram capazes de induzir morte significativa de neurônios da ponte e do hipocampo, mas sim alterar a morfologia destas células. ANT foram capazes de prevenir este efeito. Estes resultados sugerem que as ANT podem atuar como coadjuvantes no tratamento de doenças caracterizadas por episódios de neuroinflamação e desmielinização, dentre estas se destaca a Esclerose Múltipla.

Palavras-chave: Desmielinização. Neuroinflamação. Antocianinas. Bombas iônicas. Estresse oxidativo. Roedores.

ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree
Post-Graduating Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

ASSOCIATION BETWEEN ANTHOCYANINS CONSUMPTION AND PREVENTION OF COGNITIVE, NEUROCHEMICAL AND INFLAMMATORY ALTERATIONS IN EXPERIMENTAL MODELS OF DEMYELINATION AND NEUROINFLAMMATION IN RODENTS

AUTHOR: FABIANO BARBOSA CARVALHO

ADVISOR: CINTHIA MELAZZO DE ANDRADE

CO-ADVISOR: JESSIÉ MARTINS GUTIERRES

Place and Date: Santa Maria, august 14, 2015.

Anthocyanins (ANT) are phytonutrients with antioxidant and neuroprotective properties. In this context, this study sought evidence of a possible protective effect of ANT on models of demyelination and neuroinflammation in rodents. Rats were submitted to the experimental demyelination by ethidium bromide injection (EB, 0.1% in saline, 10 μ L) in the pons. In addition, an in vitro experiment was conducted to check whether ANT (1-100 μ g/mL) are able to reduce the oxidative and nitrosative stress in pons of rats exposed to hydrogen peroxide (H_2O_2 , 4 mM) and sodium nitroprusside (NPS, 1 mM). C57BL6 mice were subjected to neuroinflammation by acute administration lipopolysaccharide (LPS 250 μ g/kg, 5 mL/kg, in saline) intraperitoneally. ANT doses in both protocols were 30 and 100 mg/kg (via oral by gavage, vehicle saline). The ANT were able to neutralize the reactive species induced by H_2O_2 and by NPS reducing the malondialdehyde, protein carbonyl and nitrites and nitrates (NOx) contents. In relation to the model of toxic demyelination, ANT obtained from grape skins were administered during 7 days from the BE injection. On the seventh day the animals were euthanized. It can be seen a protective effect of ANT on the increase in oxidative stress markers: malondialdehyde, carbonyl protein and NOx levels. ANT also protected the reduction in superoxide dismutase activity and the NPSH / GSH content. A negative correlation showed an increase in markers of oxidative stress and the reduction in activity of the enzymes Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase. ANT restored the activity of ions pumps. In parallel, ANT reduced the increase in interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumoral necrosis factor (TNF)- α and interferon (INF)- γ induced by the EB. ANT suppressed the local inflammatory infiltrate, the presence of neutrophils and reduced demyelination area. In relation to neuroinflammation model, the pretreatment ten days with ANT from blueberry prevented the memory loss induced by LPS administered post-training. ANT also prevented the increased in the malondialdehyde, carbonyl protein and NOx levels 4 and 24 hours post-LPS administration in the cerebral cortex and hippocampus. ANT not prevented the reduction in the Na^+ , K^+ -ATPase activity but were able to suppress the neutrophil infiltration and microglial immunoreactivity in the hippocampus 24 hours after LPS administration. The neuroinflammation and demyelination were not able to induce significant neuronal death but alter the morphology of these cells. ANT were able to prevent this effect. These results suggest that ANT can act as adjuvants in the treatment of diseases characterized by neuroinflammation and demyelination episodes, among them stands out Multiple Sclerosis.

Keywords: Demyelination. Neuroinflammation. Anthocyanins. Ionic pumps. Oxidative stress. Rodents.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

- Figura 1 – Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração29
- Figura 2 – Mecanismos dos flavonóides sobre vias de sinalização e de sobrevivência neuronal e sobre a performance cognitiva..... 32
- Figura 3 – Estrutura química geral das principais antocianidinas34
- Figura 4 – A geografia da Esclerose Múltipla: Prevalência para 100:000 habitantes42
- Figura 5 – Bainha de mielina em neurônios do sistema nervoso central (*CNS*) e sistema nervoso periférico (*PNS*). Na figura podem ser observados: *neuron cell body* (corpo celular do neurônio), *oligodendrocyte* (oligodendrócitos), *perinodal astrocyte* (astrócitos que fazem comunicação com os neurônios na região dos nodos de Ranvier), *Nodes* (Nodos de Ranvier), *Schwann cell* (células de Schwann), *internode* (espaço entre os nodos de Ranvier que é composto pela bainha de mielina)43
- Figura 6 – Etiopatologia da Esclerose Múltipla45
- Figura 7 – Relação entre a inflamação e a degeneração durante a progressão da Esclerose Múltipla: Uma visão global sobre surtos e remissões. A) Representa o escore para desabilidades (*disability score*) entre as fases de surto-remissão (*relapsing-remitting*). B) Representa a relação entre a desmielinização da substância branca (*active white matter demyelination*) versus desmielinização da substância cinzenta (*gray matter demyelination*). C) Representa o dano axonal agudo (*acute axonal damage*) versus atrofia cerebral total (*total brain atrophy*).....47

Discussão

- Figura 8 – Desmielinização e Neuroinflamação: Informações sobre os protocolos experimentais do presente estudo..... 113
- Figura 9 – Desmielinização e Neuroinflamação: Efeito protetor das antocianinas sobre os parâmetros comportamentais, morfológicos e bioquímicos analisados 117

Apêndice

- Figura 1 – Efeito da exposição de culturas de neurônios de hipocampo a antocianinas (ANT, 100µg/mL) e a insultos de privação de glicose e oxigênio (OGD, 2 horas) sobre a liberação da lactato desidrogenase (LDH): efeito das antocianinas durante o estímulo OGD e pós-insulto (A); efeito das antocianinas somente pós-insulto (B) e 12 horas pós-insulto (C); efeito das antocianinas durante o estímulo OGD (D); efeito das antocianinas durante o estímulo OGD e 4 horas pós-insulto (E); efeito das antocianinas somente 4 horas pós-insulto (F) e efeito das antocianinas 6 horas pós-insulto (G). Morfologia nuclear de neurônios submetidos a OGD e expostos com antocianinas num intervalo de 6 horas, 6 horas pós estímulo (H). Seta fechada aponta núcleos considerados como controle. Seta aberta representa núcleos considerados apoptóticos. *Denota diferença significativa em relação

	ao grupo veículo. #Denota diferença significativa em relação ao grupo OGD. Anova de duas vias seguido pelo <i>post-hoc</i> de Bonferroni (n=4/10).....	158
Figura 2 –	Efeito da exposição de culturas de neurônios hipocâmpais com diferentes concentrações de antocianinas (ANT, 1-100 µg/mL) durante o 20 e 240 minutos sobre a liberação da lactato desidrogenase (LDH). Anova de uma seguido pelo <i>post-hoc</i> de Student Newman Keuls (n=3).....	159
Figura 3 –	Efeito da exposição de culturas de neurônios de hipocampo com antocianinas (ANT, 100 µg/mL) e a insultos pelos agonistas glutamatérgicos (AMPA ou NMDA, 100 µM, 20 minutos) sobre a liberação da lactato desidrogenase (LDH): efeito das antocianinas durante o estímulo AMPA (A); efeito das antocianinas durante o estímulo AMPA e pós-insulto (B); efeito das antocianinas somente pós-insulto (C) e efeito das antocianinas 1 hora pós-insulto (D); efeito das antocianinas durante o estímulo NMDA (E); efeito das antocianinas durante o estímulo NMDA e pós-insulto (F); efeito das antocianinas somente pós-insulto (G) e efeito das antocianinas 1 hora pós-insulto (H). *Denota diferença significativa em relação ao grupo veículo. #Denota diferença significativa em relação ao grupo AMPA/NMDA. Anova de duas vias seguido pelo <i>post-hoc</i> de Bonferroni (n=4/10)	160
Figura 4 –	Morfologia nuclear de neurônios submetidos a insultos por NMDA (100 µM, 20 minutos) e expostos com antocianinas num intervalo de 1 hora, 1 hora pós-estímulo. Seta fechada aponta núcleos considerado como controle. Seta aberta representa núcleos considerados apoptóticos. →Representa núcleos considerados necróticos. *Denota diferença significativa em relação ao grupo veículo. #Denota diferença significativa em relação ao grupo NMDA. Anova de duas vias seguido pelo <i>post-hoc</i> de Bonferroni (n=4/10)	161
Figura 5 –	Efeito das antocianinas (1-100 µg/mL) e MK-801 (10 µM) sobre a ligação do [³ H]-MK-801 em membranas de cérebro de ratos. Dados expressos em média ± erro padrão (n=3/duplicata). ***p<0.001 comparado ao grupo veículo (Teste T de Student).....	162

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos de biodisponibilidade das antocianinas	35
Tabela 2 – Revisão geral sobre evidências neuroprotetoras das antocianinas na última década: possíveis alvos moleculares	37

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Adenosina monofosfato
AMPA	Ácido -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
AMPC	AMP cíclico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASK-1	Cinase reguladora de sinal apoptótico
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BE	Brometo de etídio
CaMKII	Cinase dependente de cálcio Calmodulina -2
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CREB	Proteína ligante ao elemento de resposta ao AMPC
EAE	Encefalomielite autoimune experimental
EM	Esclerose Múltipla
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERK1/2	Cinase regulada por sinais extracelulares
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GLUT	Transportadores de glicose
GSK3-B	Glicogênio sintase cinase B
IL-	Interleucina-
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
JNK1/2/3	Cinase c-Jun N-terminal 1/2/3
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos
MCAo	Oclusão da artéria cerebral média
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NF-KB	Fator nuclear kappa beta
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOx	Nitritos e nitratos
OGD	Privação de glicose e oxigênio

p38	Cinase ativada por mitógeno p38
PI3K	Fosfatidil Inositol 3 cinase
PKA	Proteína cinase dependente de AMPc
PKC	Proteína cinase dependente de cálcio
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TLR	Toll like receptors
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF- β	Fator de crescimento endotelial vascula-beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	Polifenóis e Flavonóides: uma breve revisão	29
1.2	Antocianinas: Estrutura química e propriedades biológicas	33
1.3	Antocianinas como alimentos funcionais e nutracêuticos	40
1.4	Aspectos epidemiológicos sobre a Esclerose Múltipla	41
1.5	A patofisiologia da Esclerose Múltipla: O importante papel dos axônios e da bainha de mielina	42
1.6	A enzima Na⁺,K⁺-ATPase e seu importante papel na transmissão do impulso nervoso pelo axônios	45
1.7	EM: Manifestações clínicas e progressão da doença	47
1.8	Brometo de Etídio: Modelo Experimental para estudos de desmielinização	49
1.9	Lipopolissacarídeo (LPS): Modelo Experimental para estudos de neuroinflamação	50
1.10	Tratamento para EM: podemos nos permitir um certo otimismo?	53
1.11	Justificativa	53
2	OBJETIVOS	55
2.1	Objetivo geral	57
2.2	Objetivos específicos	57
3	RESULTADOS	59
3.1	Artigo I: “Anthocyanins suppress the secretion of proinflammatory mediators and oxidative stress, and restore ion pump activities in demyelination”	61
3.2	Manuscrito I: “Anthocyanins control neuroinflammation and consequent memory dysfunction in mice exposed to lipopolysaccharide”	75
4	DISCUSSÃO	109
5	CONCLUSÃO	119
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
	APÊNDICES	145
	Resultados preliminares: “Mecanismos protetores das antocianinas (<i>Vitis vinifera</i>) em insultos excitotóxicos induzidos pela privação de glicose e oxigênio e por agonistas glutamatérgicos em culturas primárias de neurônios de hipocampo de ratos.”	147

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigo I e manuscrito I. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio artigo e manuscrito e representam a íntegra de seu respectivo estudo.

Após a seção de Resultados, pode-se encontrar os itens Discussão e Conclusão. Estas seções apresentam interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito e o artigo contido neste trabalho. As Referências Bibliográficas referem-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução, Discussão e Conclusão desta tese.

Ao término da Tese encontra-se um apêndice que refere-se aos resultados preliminares obtidos durante a execução do doutoramento sanduíche no Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, em Portugal.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Polifenóis e Flavonóides: uma breve revisão

Os compostos fenólicos são substâncias naturalmente encontradas em plantas e se caracterizam por possuírem uma hidroxila ou mais ligadas a um anel aromático. Estas substâncias são provenientes do metabolismo secundário de aminoácidos aromáticos, dentre estes a tirosina e fenilalanina; e glicídeos, pela formação de malonil-CoA que ocorre nos vegetais. Devido a grande variedade de compostos fenólicos identificados, estes foram divididos em diferentes classes e dentre elas se destaca a classe dos flavonóides (YOSHIDA; HATANO; ITO, 2000; YOSHIMURA, 2014).

Os flavonóides são, portanto, compostos fenólicos e apresentam em sua estrutura química 15 átomos de carbono (C) em seu núcleo básico arranjados na configuração C₆-C₃-C₆, ou seja, dois anéis aromáticos são unidos por uma estrutura de 3 carbonos. Estes 3 átomos de carbono podem formar um terceiro anel ou ainda ligarem-se a vários substituintes (AHERNE; O'BRIEN, 2002; SPENCER, 2008). A figura 1 demonstra o 2-fenilcromano, núcleo base dos flavonóides, e esta classe pode ser dividida em seis subgrupos com base na extensão da oxidação do anel C, no padrão de hidroxilação da estrutura do anel e na substituição da posição do grupo C-3- (figura 1).

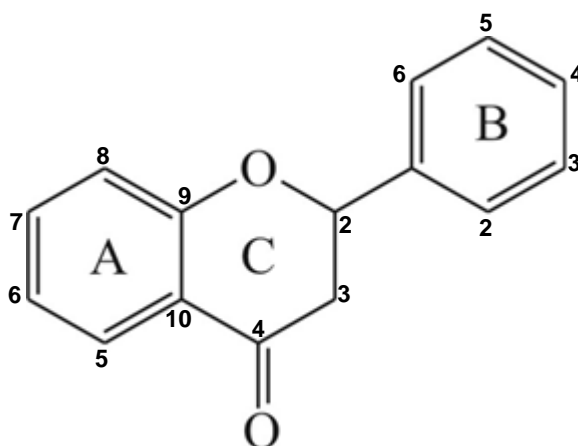


Figura 1 – Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração

Fonte: Adaptado de (SPENCER, 2008).

Os flavonóides foram descritos pela primeira vez no ano de 1664 pelo pesquisador Robert Boyle. Em suma, verificou-se nesta experiência uma mudança na coloração do licor de violeta após a adição de algumas gotas de vinagre. Boyle percebeu que o licor apresentava tonalidade vermelha em meio ácido; e tonalidade verde em meio básico. Desta forma foi descoberto o efeito de compostos ácidos e básicos sobre a pigmentação de extratos provenientes de flores. Tal evento proporcionou a criação dos primeiros indicadores de pH em papel e solução (TERCI; ROSSI, 2002). Desde a sua descoberta, mais de 4.000 flavonóides já foram isolados e identificados em alimentos de origem vegetal; e estes compostos, comumente desconhecidos para a população em geral, sempre estiveram presentes na vida e na história da humanidade. Estima-se que populações de países europeus, por exemplo, consumam em média 1g diária de flavonóides (RUSAK; GUTZEIL; MÜLLER, 2005).

Representando um dos fatores de estilo de vida mais importantes, a dieta pode influenciar consideravelmente a qualidade de vida bem como a incidência e o aparecimento de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (SPENCER et al., 2012; WILLIAMS; SPENCER, 2012; RODRIGUEZ-MATEOS et al., 2013; MACREADY et al., 2014). Curiosamente, esta associação já havia sido feita a muitos anos atrás, mais precisamente nos anos entre 460-370 A.C. Hipócrates, considerado o pai da medicina, em um de seus relatos deixa para história uma de suas célebres frases "...deixe o alimento ser o seu remédio e o remédio seu alimento".

De fato, uma combinação de estudos pré-clínicos e dados epidemiológicos sugerem que uma dieta equilibrada associada a um consumo frequente de flavonóides podem ser eficazes na prevenção de inúmeras condições patológicas, incluindo doenças neurodegenerativas e na piora do desempenho cognitivo associado à idade (SPENCER; VAUZOUR; RENDEIRO, 2009; MACREADY et al., 2010; RENDEIRO et al., 2012; WILLIAMS; SPENCER, 2012; VAUZOUR, 2014). Em virtude destes achados, uma associação direta entre consumo de flavonóides e a melhora na saúde neurológica tornou-se um importante assunto a ser investigado. Além disso, uma possível prevenção de doenças através de uma alimentação saudável pode ser uma importante ferramenta contribuindo na melhora da saúde e qualidade de vida da humanidade.

O potencial de flavonóides para melhorar as funções neurológicas parece estar relacionado com a sua capacidade de interagir com vias de sinalização de sobrevivência neuronal e glial, de melhorar o aporte de oxigênio e nutrientes através da regulação do sistema vascular cerebral e periférico, e de reduzir os danos e perdas neuronais induzidas por várias

espécies neurotóxicas e inflamatórias (SPENCER; VAUZOUR; RENDEIRO, 2009; SPENCER et al., 2012; WILLIAMS; SPENCER, 2012).

Willians e Spencer (2012) fizeram um levantamento sobre a atividade dos flavonóides e/ou seus metabólitos sobre processos biológicos envolvendo a neuroproteção e a sobrevivência celular. Nesta revisão foi demonstrado que os flavonóides podem regular inúmeros processos fisiológicos distintos, nos quais se incluem: interações em vias de sinalização entre neurônio-glia, aumento na atividade e na sobrevivência neuronal, aumento na atividade de enzimas antioxidantes, aumento na expressão de proteínas neuronais envolvidas na plasticidade sináptica e no reparo neuronal, aumento do fluxo sanguíneo cerebral, dentre outros (WILLIAMS; SPENCER, 2012). As possíveis interações nas vias de sinalização intracelular e sua influência sobre a prevenção da neurodegeneração e do envelhecimento bem como na melhora da memória e cognição podem ser vistas mais detalhadamente na figura 2. Primeiramente, a inibição das vias ativadas pelas proteínas MAPKs (proteínas cinases ativadas por mitógenos), especialmente a cinase reguladora de sinal apoptótico (ASK-1), cinase c-Jun N-terminal (JNK 1/2/3), cinase ativada por mitógeno-p38 (p38) promovem uma redução na atividade e expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e nos níveis de óxido nítrico (NO) (WILLIAMS; SPENCER, 2012). Em paralelo, uma supressão destas mesmas vias contribui para uma redução na relação Bad/Bcl (família de proteínas associadas com a morte celular) e na redução da ativação de caspases (um grupo de proteases indutoras da apoptose celular). Por estes mecanismos os flavonóides podem reduzir a neuroinflamação e contribuir para proteção da viabilidade neuronal. Como produto final destas vias há uma prevenção contra os efeitos deletérios da neurodegeneração e do envelhecimento cerebral (figura 2).

Dentre os demais alvos moleculares ativados pelos flavonóides também se encontram a proteína cinase regulada por sinais extracelulares (ERK1/2) e a Akt (também conhecida como proteína cinase B, PKB). Estas cinases promovem um aumento na fosforilação da proteína ligante ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB) e um aumento na atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), os quais promovem um aumento do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e ativação do fator respiratório nuclear (NRF, envolvido na regulação de genes metabólicos que controlam a respiração celular), Arc (*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*), mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) e fator de crescimento endotelial vascular- β (VEGF- β). Estas moléculas sinalizadoras preservam a morfologia neuronal, melhoram as funções metabólicas e o fluxo

sanguíneo cerebral. Como resultado da ativação destas vias, há uma melhora da memória e da cognição (figura 2).

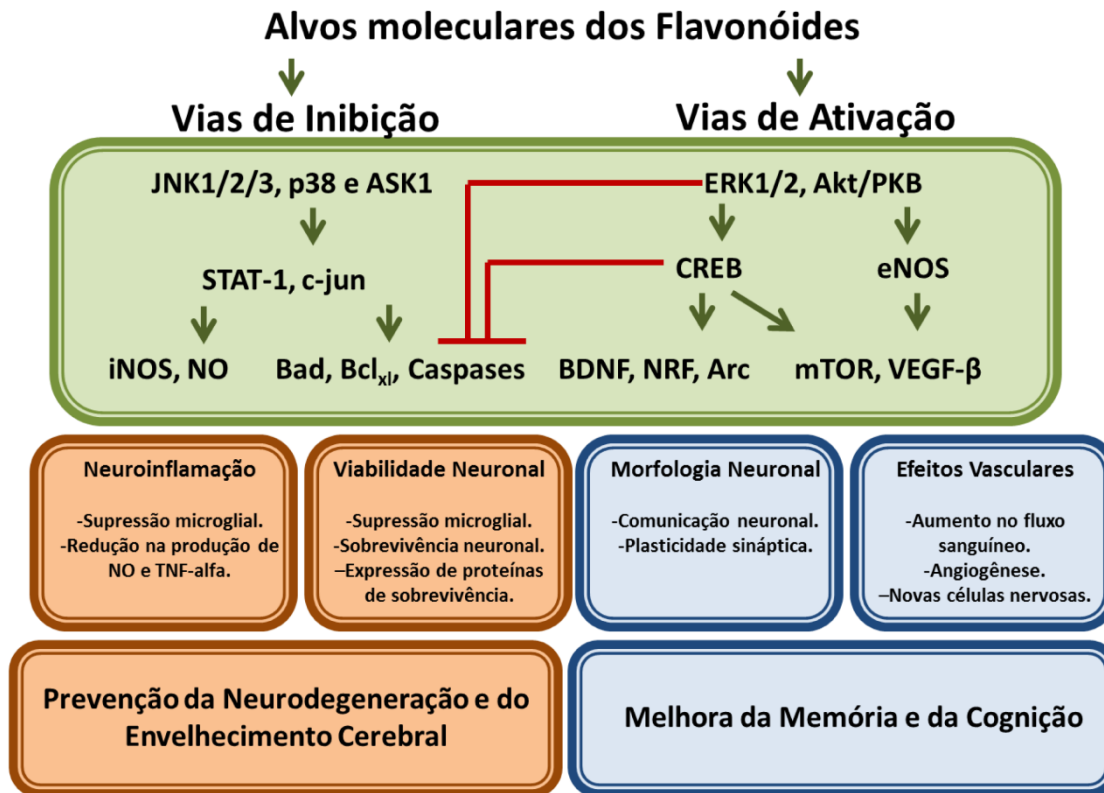


Figura 2 – Mecanismos de ação dos flavonóides sobre vias de sinalização e de sobrevivência neuronal e sobre a *performance* cognitiva

Fonte: Adaptado (WILLIAMS; SPENCER, 2012).

Como visto anteriormente, a capacidade dos flavonóides em influenciar diversas funções vitais no sistema nervoso e isto dependerá, de certa forma, da sua acessibilidade para o cérebro através da barreira hematoencefálica. Evidências apontam a capacidade de flavonóides e/ou seus metabólitos em atravessar a barreira hematoencefálica e, atualmente, existem uma grande variedade de estudos científicos *in vitro* e em diferentes modelos animais demonstrando a presença de flavonóides nas mais diversas estruturas encefálicas (YOUDIM et al., 2003; YOUDIM et al., 2004; FARIA et al., 2011; FARIA et al., 2014; FERRI et al., 2015). Dentre os flavonóides capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e com grande potencial neuroprotetor se destacam a classe das antocianinas. Estas já foram detectadas em diferentes estruturas encefálicas de roedores e de suínos (ANDRES-LACUEVA et al., 2005;

PASSAMONTI et al., 2005; KALT et al., 2008) e têm sido apontadas como promissoras agentes coadjuvantes úteis contra patologias que acometem o sistema nervoso (ZAFRA-STONE et al., 2007; DEL RIO; BORGES; CROZIER, 2010; TSUDA, 2012).

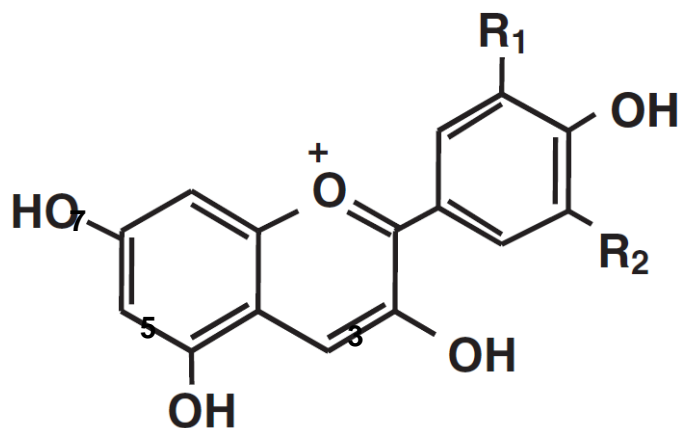
1.2 Antocianinas: Estrutura química e propriedades biológicas

O termo antocianinas foi apresentado primeiramente por Ludwig Marquart no ano de 1835 na sua obra intitulada *Die Farben der Bluthen* (do alemão, As Cores das Flores). Antocianina deriva-se das palavras gregas *anthos* (flor) e *kyans* (azul) e foi utilizada para indicar de maneira ampla uma família de pigmentos naturais, independente do tom de sua coloração (WHITING, 2001). Em virtude de sua capacidade de atuar como corante, as antocianinas são amplamente utilizadas na indústria de alimentos. De fato, uma das prerrogativas de seu uso como corante baseia-se no fato de que a humanidade está muito bem adaptada ao consumo diário destes compostos, uma vez que as antocianinas fazem parte da dieta do homem há milhares de anos. Também, a substituição de produtos químicos artificiais por um antioxidante natural é visto com bons olhos pelos profissionais da saúde e pela população em geral (GUPTA; PRAKASH, 2014; KOZLOWSKA; SZOSTAK-WEGIEREK, 2014; LASEKAN, 2014; SANTOS-BUELGA; MATEUS; DE FREITAS, 2014; VAN HUNG, 2014).

As antocianinas apresentam-se na forma de glicosídeos, no qual uma molécula de antocianidina está acoplada a um açúcar. A parte deste pigmento que se apresenta na forma livre de açúcar, genericamente conhecida como aglicona, é denominada antocianidina (TSUDA, 2012). Embora o papel das antocianinas como um fator alimentar funcional permanece relativamente menos estabelecido que o de outros flavonóides, um progresso tem sido feito em nível molecular nos últimos anos (TSUDA, 2012).

Na natureza, existe uma enorme variedade de antocianinas e a principal diferença estrutural está relacionada ao número de radicais hidroxilados, a natureza, o número de açúcares e a posição em que estes encontram-se ligados (KONG et al., 2003). Já foram descritos aproximadamente 500 tipos de antocianinas e 23 tipos de antocianidinas diferentes, sendo mais frequentemente encontradas a cianidina, delphinidina e malvinidina (KONG et al., 2003; ANDERSEN; MARKHAM, 2006). A figura 3 mostra a estrutura química geral das antocianidinas bem como as possíveis variações dos grupos radicais (R_1 e/ou R_2) por H, OH

e/ou OCH₃. A glicona (denominada a parte açúcar) se liga a antocianidina na posição (ou carbono) 3 formando um heteromonosídeo. No caso de heteropoliosídeos (2 açúcares) as ligações podem ocorrer nas posições 3 e 5 ou 3 e 7 (Figura 3).



R ₁	R ₂	ABREVIÇÃO	COR	ANTOCIANIDINA
H	H	<i>Pg</i>	Não reportado	Pelargonidina
OH	H	<i>Cy</i>	Laranja / Vermelho	Cianidina
OCH ₃	H	<i>Pn</i>	Laranja / Vermelho	Peonidina
OH	OH	<i>Dp</i>	Azul / Vermelho	Delfinidina
OCH ₃	OH	<i>Pt</i>	Azul / Vermelho	Petunidina
OCH ₃	OCH ₃	<i>Mv</i>	Azul / Vermelho	Malvinidina

Figura 3 – Estrutura química geral das principais antocianidinas

Fonte: Adaptado de (CASTANEDA-OVANDO et al., 2009; TSUDA, 2012).

As antocianinas são obtidas dos alimentos na forma glicosilada, ou seja, com um açúcar ligado a sua estrutura. A maior parte de sua absorção ocorre no estômago e um dos fatores que favorece a rápida absorção é a presença de transportadores bilitranslocases (PASSAMONTI; VRHOVSEK; MATTIVI, 2002; PASSAMONTI et al., 2003). Em relação ao intestino, sabe-se que este órgão apresenta uma capacidade menor na absorção das antocianinas e o mecanismo de transporte através da membrana celular se dá pela ação dos transportadores de glicose 1 e 2 (GLUT-1 e GLUT-2) (HOLLMAN et al., 1999; FARIA et al., 2009; ZOU et al., 2014).

McGhie e Walton (2007) fizeram um estudo sobre a biodisponibilidade de diferentes antocianinas em diferentes espécies animais (MCGHIE; WALTON, 2007). Os achados em geral pontuaram uma concentração máxima plasmática para as antocianinas na primeira hora pós-consumo. Mais detalhes desta revisão podem ser visualizadas na tabela 1.

Tabela 1 – Estudos de biodisponibilidade das antocianinas

Espécie	Fonte de Antocianinas	Dose (por kg de peso corporal)	Concentração Máxima Plasmática C_{max}	Tempo p/ C_{max}	Referência
Rato	<i>Bilberry</i>	400 mg/kg	2 a 3 $\mu\text{g/mL}$	0,25h	(MORAZZONI et al., 1991)
Rato	<i>Eldelberry</i>	360 mg/kg	3,8 $\mu\text{mol/L}$	0,25h	(MIYAZAWA et al., 1999)
Rato	<i>Blackcurrant</i>	100 mg/kg	0,4 $\mu\text{mol/L}$	0,25h	(ICHIYANAGI et al., 2004)
Coelho	<i>Blackcurrant</i>	(Dp-3- glicosídeo) 117 mg/kg	780 ng/mL	0,5h	(NIELSEN et al., 2003)
		53 mg/kg	450 ng/mL	0,5h	(NIELSEN et al., 2003)
Humana	<i>Blueberry</i>	1200 mg (total)	0,029 $\mu\text{mol/L}$	4h	(MAZZA et al., 2002)
Humana	<i>Elderberry</i>	720 mg (total)	0,097 $\mu\text{mol/L}$	1,2h	(MILBURY et al., 2002)
Humana	Suco de uva (400mL)	284 mg (total)	100 ng/mL	0,5h	(FRANK et al., 2003)
Humana	Vinho tinto (400mL)	180 mg (total)	43 ng/mL	1,5h	(FRANK et al., 2003)

Traduções: *Blueberry* (mirtilo proveniente das Américas); *Bilberry* (mirtilo de origem Européia); *Blackcurrant* (cassis ou groselha-negra do norte europeu); *Elderberry* (fruto proveniente do *Sabumcus*, popularmente conhecido como sabugueiro).

Fonte: Adaptado de (MCGHIE; WALTON, 2007).

Em relação às concentrações encefálicas, Kalt & Blunberg (2008) realizaram um estudo de biodisponibilidade de diferentes antocianinas em porcos. Segundo os autores, este é o modelo mais adequado para avaliar a capacidade de absorção digestiva humana. Os animais foram alimentados com 0, 1, 2 ou 4 % de mirtilo (% em relação a consumo da dieta convencional) por 4 semanas. Após este período, 11 diferentes antocianinas foram detectadas no córtex cerebral, cerebelo e diencéfalo. As concentrações variaram de 0,279 nmol/g de tecido para o cortex cerebral e 0,432 nmol/g de tecido para o diencéfalo (KALT et al., 2008). Em outro estudo, Talavera e colaboradores (2005) alimentaram ratos com uma dieta enriquecida com *blackberry* (*Rubus fruticosus* L.) durante 15 dias e foi notado no encéfalo um conteúdo de cianidina-3-glicosídeo aproximado de $0,21 \pm 0,05 \text{ nmol/g}$ de tecido,

concentrações estas mais elevadas que as plasmáticas ($0,15 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/mL}$ de plasma). Além disso, cianidina-3-glicosídeo mostrou-se a antocianina mais proeminente nos tecidos analisados, correspondendo um total de 84% das antocianinas totais investigadas (TALAVERA et al., 2005).

Dentre as primeiras propriedades biológicas descritas para as antocianinas destaca-se a sua capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) impedindo a oxidação e nitrosação de moléculas biológicas (BAGCHI et al., 1998; SHU et al., 2002; CHO et al., 2003). Em seguida, no ano de 2006, um dos primeiros relatos de um efeito neuroprotetor das antocianinas em potencial estava voltado para a isquemia cerebral. Tal efeito observado *in vitro* em células PC12 as quais são derivadas de uma linhagem de feocromocitoma e que exibem características semelhantes a de neurônios. Estas células foram submetidas a privação de glicose e de oxigênio (OGD), um modelo para isquemia *in vitro*, e num modelo de isquemia cerebral global em ratos (KANG et al., 2006). Mesmo sem um mecanismo traçado, Kang e colaboradores (2006) verificaram que a cianidina-3-*O*- β -d-glucopiranosídeo isolada da *mulberry*, fruta semelhante a amora brasileira, reduziu a morte de células PC12 e de populações neuronais em ratos frente a OGD. Adicionalmente, Min e colaboradores (2011) mostraram que 2 mg/kg de antocianinas é capaz de melhorar o escore de desabilidades motoras apresentado pelos roedores, reduzir a área do infarto e também aumentar a atividade de enzimas antioxidantes (MIN et al., 2011). Estes achados apontaram uma perspectiva promissora das antocianinas em potencial para processos isquêmicos, no entanto evidências sobre mecanismos de ação das antocianinas ainda permanecem escassos no meio científico.

Na última década, as antocianinas ganharam uma maior repercussão no meio científico. Apontadas como agentes nootrópicos, uma classe de compostos que aumentam o desempenho cognitivo no ser humano, as antocianinas foram capazes de melhorar a memória e cognição tanto em ratos quanto em humanos idosos (ANDRES-LACUEVA et al., 2005; RAMIREZ et al., 2005; WILLIAMS et al., 2008; GUTIERRES et al., 2012). Em paralelo, novas evidências da proteção das antocianinas perante modelos experimentais de doenças neurodegenerativas começaram a surgir. Dentre estes destacam-se estudos voltados a modelos experimentais para déficits cognitivos associados a piora na sinalização colinérgica (com uso de escopolamina, um antagonista não seletivo para receptores muscarínico) (GUTIERRES et al., 2012; GUTIERRES et al., 2014a), na doença de Alzheimer (DARVESH et al., 2010; SHIH et al., 2010; QIN; ZHANG; QIN, 2013; VEPSALAINEN et al., 2013; GUTIERRES et al., 2014b) e na doença de Parkinson (KIM et al., 2010; STRATHEARN

et al., 2014). No entanto, trabalhos utilizando modelos experimentais para esclerose múltipla ainda permanecem ausentes na literatura.

Enquanto os mecanismos de proteção envolvidos nos benefícios das antocianinas para a saúde permanecem desconhecidos, algumas evidências recentes mostraram que as antocianinas atuam em vias de sinalização pró-inflamatórias e anti-apoptóticas. Como descrito por Poulouse e colaboradores (2012), estes compostos foram eficazes em prevenir o aumento na produção de óxido nítrico (NO), reduzir a expressão das enzimas iNOS, isoforma que atua principalmente mediante processos patológicos; e ciclo-oxigenase-2 (COX-2), envolvida na produção de prostanoídes da inflamação. Em paralelo, também foi verificado neste mesmo estudo uma redução na produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), citocina indutora de apoptose e mediadora de inúmeras ações pró-inflamatórias; e da fosforilação do fator nuclear kappa B (NF-kB) em cultura de células microgлияis (POULOSE et al., 2012).

Em seguida, outro estudo reportou que concentrações acima de 10 $\mu\text{g/mL}$ de antocianinas são capazes de reduzir a translocação do NF-kB para o núcleo e, desta forma, suprimir a transcrição de RNA mensageiros para IL-1B em macrófagos expostos ao lipopolissacarídeo (LPS) (LEE et al., 2014).

Na tabela 2 pode ser encontrada uma revisão global sobre demais alvos moleculares nos quais as antocianinas atuam em diferentes modelos de neurotoxicidade.

Tabela 2 – Revisão geral sobre evidências neuroprotetoras das antocianinas na última década: possíveis alvos moleculares

Referência (autor, ano)	Concentração ou dose de antocianinas	Modelo experimental utilizado	Neuroproteção e possíveis alvos moleculares envolvidos
(SHIN; PARK; KIM, 2006)	300 mg/kg antocianinas totais	Ratos submetidos a MCAo	Redução área de infarto e número de células mortas. Antocianinas previnem o aumento na fosforilação da JNK e da p53 induzidas pela MCAo.
(WILLIAMS, C. M. et al., 2008)	Antocianinas totais purificadas da casca da fruta <i>blueberry</i> . Dose correspondente a 2% da dieta.	Ratos jovens (6 meses) e idosos (18 meses).	Uma hora pós-administração os níveis cerebrais foram quantificados próximos a 150 $\eta\text{mol/mg}$ tecido. Antocianinas preveniram a redução na fosforilação da CREB e no conteúdo de BDNF induzido pelo envelhecimento. O mesmo efeito foi observado para a fosforilação da ERK1/2 e AKT.

(BHUIYAN et al., 2012)	5-10 µg/mL de antocianinas provenientes do Korean <i>Black Soybean</i> e 10-20 µM de Cianidina-3-glicosídeo	Cultura de neurônios corticais submetidos a OGD e a excitotoxicidade induzida por glutamato	Antocianinas totais e cianidina-3-glicosídeo são capazes de restaurar a função mitocondrial, prevenir a piora no potencial de membrana, impedir a morte neuronal e a produção de EROs em neurônios.
(POULOSE et al., 2012)	Antocianinas provenientes do açáí utilizadas numa concentração entre 50-1.000 µg/mL	Insultos com metanol e LPS em cultura de células microgliais (BV-2)	Concentrações acima de 125 µg/mL de antocianinas previnem o aumento na síntese de NO, reduzem a expressão da iNOS, do conteúdo de TNF-α. Foram observados também redução na ativação da p-38, da fosforilação do NF-kB e da expressão da COX-2.
(ALI SHAH et al., 2013)	Antocianinas purificadas da Korean <i>Black Soybean</i> na concentração de 0,1 mg/mL	Cultura de neurônios expostos a etanol	Antocianinas reduzem os níveis de proteínas pró-apoptóticas ativadas pelo etanol como a Bax e caspase-3. Em contrapartida, aumentam o conteúdo da proteína anti-apoptótica Bcl-2, e também restabelecem os níveis reduzidos de GABA1R e da CaMKII fosforilada induzidos pelo etanol.
(SHAH; YOON; KIM, 2014)	Antocianinas provenientes do <i>Black bean</i> na dose de 100 mg/kg	Ratos filhotes (7 dias de idade) submetidos a neurotoxicidade por etanol	Antocianinas revertem a redução na expressão e na fosforilação de receptores AMPA induzido pelo etanol. Também revertem a redução na expressão de receptores GABAB1 e a redução na fosforilação da CREB induzidos pelo etanol. Adicionalmente, revertem aumento na fosforilação da JNK, NF-kB e na expressão da COX-2 induzidos pelo etanol. Em paralelo, reduzem <i>per se</i> a fosforilação da JNK e do NF-kB. Antocianinas reduzem o aumento do citocromo-c, caspase 3 e 9 e aumentam a fosforilação da PI3K, AKT e GSK3-B, os quais foram reduzidos pelo etanol.
(LEE, S. G. et al., 2014)	Antocianinas provenientes da <i>Blueberry</i> , da <i>Blackberry</i> e do <i>Blackcurrant</i> . Concentrações entre 0-20 µg/mL	Cultura de macrófagos expostos a LPS (100 ng/mL)	LPS promove um aumento na expressão de IL-1β e TNF-α. Concentrações acima de 10 µg/mL de antocianinas reduzem a expressão de IL-1β e TNF-α. Foi observado também que as antocianinas reduzem a translocação do NF-kB para o núcleo.
(TAN et al., 2014)	<i>Blueberry</i> (200 mg/kg) e cianidina-3-	Camundongos tipo SAMP8 tratados	Impedem a piora congênita de animais idosos e aumentam a fosforilação da

	galactosídeo (50 mg/kg)	com <i>blueberry</i> ou C-3-galactosídeo	ERK1/2 em animais com senescência acelerada.
(ULLAH; PARK; KIM, 2014)	Antocianinas extraídas da Korean <i>Black bean</i> na concentração de 0,2 mg/mL	Neurônios de hipocampo expostos a excitotoxicidade induzida por ácido kaínico (100 µM)	Após 2 horas de estímulo com ácido kaínico, as antocianinas impedem o aumento do conteúdo de caspase-3 e da proteína Bax. Em paralelo, antocianinas previnem a redução no conteúdo de Bcl-2 e o aumento no conteúdo de citocromo-c. Também reduzem o aumento na fosforilação da AMPK alfa induzido pelo ácido kaínico.
(SKEMIENE; LIOBIKAS; BORUTAITE, 2015) (SKEMIENE et al., 2013)	Delfinidina-3-glicosídeo Cianidina-3-glicosídeo Petunidina-3-glicosídeo (20 µM)	Ratos submetidos a isquemia cardíaca	Embora estes estudos não sejam focados especialmente para o SNC, eles mostram as primeiras evidências de que as antocianinas atuam quimicamente sobre o citocromo-c. Nestes estudos foram reportados a sua capacidade em reduzir o citocromo-c. Sabe-se que a forma oxidada do citocromo-c está mais envolvida na ativação de caspases e na apoptose celular. Além disto, as antocianinas foram capazes de recuperar a função do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial bem como restabelecer níveis de ATP que foram reduzidos pela isquemia.

Abreviações: AKT (proteína cinase B); AMPA (Ácido alfa-Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol Propiônico); AMPK (proteína cinase ativada por AMP cíclico); ATP (trifosfato de adenosina); CaMKII (proteína cinase dependente de Ca²⁺/Calmodulina); COX-2 (ciclooxigenase-2); CREB (fator responsivo ao elemento AMP cíclico); ERK1/2 (cinase ativada por sinal extracelular); GABA (Ácido gama-aminobutírico); GSK-3 (glicogênio sintase cinase 2); iNOS (óxido nítrico sintase induzível); JNK (c-Jun N-terminal cinase); LPS (lipopolissacarídeo); MCAo (oclusão da artéria cerebral média); NF-kB (fator nuclear kappa B); NO (óxido nítrico); OGD (privação de glicose e oxigênio); p38 (um tipo de MAPK); PI3K (fosfatidil-inositol 3 cinase); SAMP8 (*Senescence-accelerated mice 8*); TNF-α (fator de necrose tumoral alfa).

*Traduções: *Blueberry* (mirtilo proveniente das Américas); *Bilberry* (mirtilo de origem Européia); *Blackberry* (amoras silvestres), *Black currant* (cassis ou groselha-negra do norte europeu); Korean *Black soybean* (soja preta proveniente da Coreia); Black bean (feijão preto).

Como observado acima, inúmeros fatores podem estar envolvidos na neuroproteção induzida pelas antocianinas. O bloqueio de vias pró-apoptóticas e inflamatórias tiveram maior repercussão nesta revisão; e estas vias se relacionam com a formação de espécies reativas, danos celulares e piora na homeostasia do SNC. Desta forma, a associação das propriedades antioxidantes das antocianinas com os efeitos sobre os alvos moleculares citados acima pode

contribuir impedindo a excitotoxicidade neuronal e o desenvolvimento de doenças de origem inflamatória e degenerativa.

1.3 Antocianinas como alimentos funcionais e nutracêuticos

Estimulado por cientistas do Ministério de Saúde e Bem Estar, em 1980 foi criado no Japão um conceito sobre o uso de alimentos para o bem estar e preservação da saúde. Este passo foi pioneiro e gerou uma grande repercussão no meio científico onde iniciou-se uma busca para uma maior compreensão sobre um alimento e seu impacto positivo na saúde de um indivíduo (HARDY, 2000; KALRA, 2003).

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 18/99 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), alimento funcional é definido como sendo aquele alimento ou ingrediente (composto bioativo) que, além das funções nutritivas básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produza efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica. Em contrapartida, o nutracêutico é definido como um suplemento alimentar onde o composto bioativo é apresentado na forma farmacêutica e, por isto, encontra-se numa forma mais concentrada. Esse composto bioativo está separado da matriz original e em doses que excedem aquelas que poderiam ser obtidas diretamente do alimento (ZEISEL, 1999; COZZOLINO, 2012).

A relação entre os hábitos alimentares e o risco de doença apontam que a dieta reflete diretamente sobre a saúde humana. É aceito entre os mais diversos meios científicos que alimentos derivados de vegetais podem exercer alguns efeitos benéficos para a saúde e, em particular, sobre as doenças relacionadas com a idade (ESPIN; GARCIA-CONESA; TOMAS-BARBERAN, 2007). Por exemplo, à medida que a humanidade caminha para um aumento na expectativa de vida, doenças relacionadas à idade, dentre elas as cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes tipo II, e vários tipos de câncer começam a se expandir sobre a população. Este fato tem servido de estímulo a organizações de saúde ao redor do mundo para recomendar um aumento na ingestão de alimentos de origem vegetal a fim de melhorar nosso estado de saúde e também para retardar o desenvolvimento destas doenças (ESPIN; GARCIA-CONESA; TOMAS-BARBERAN, 2007; CHAUHAN; MEHLA, 2015).

Até agora, os benefícios das antocianinas para a saúde têm sido amplamente atribuídas às suas propriedades antioxidantes. No entanto, esforços recentes têm sido dirigidos para elucidar os mecanismos moleculares subjacentes de algumas das antocianinas para a saúde. Além disso, estudos focados em doenças neuroinflamatórias e desmielinizantes, dentre elas a esclerose múltipla (EM), ainda permanecem ausentes na literatura.

1.4 Aspectos epidemiológicos sobre a Esclerose Múltipla

A EM é uma doença crônico-progressiva caracterizada por desmielinização dos neurônios no SNC e SNP e é considerada uma das causas mais comuns de incapacitação neurológica crônica em adultos jovens (MOREIRA et al., 2000; KURSCHUS; WORTGE; WAISMAN, 2011). A incidência da EM é baixa em crianças, mas aumenta após os 18 anos de idade, atingindo um pico de incidência entre 20 e 40 anos, tornando-se raros os casos em idade acima de 50 anos. Além disto, mulheres costumam manifestar o desenvolvimento da doença 2-5 anos mais cedo que em homens (CONFAVREUX; VUKUSIC, 2006). Dados epidemiológicos da Sociedade Brasileira de EM revelaram que aproximadamente 35.000 brasileiros sejam portadores desta patologia (MENDES et al., 2000; MOREIRA et al., 2000; TILBERY et al., 2000b).

No Brasil, dados epidemiológicos mostram que a prevalência desta doença atinge de 15 a 18 casos para 100.000 habitantes, sendo a maior incidência no sul do país. As taxas de incidência mais elevadas apresentadas pela região sul se relacionam com a alta proporção de imigrantes e descendentes de europeus, especialmente alemães e italianos. Um estudo realizado por Finkelsztejn e colaboradores (2014) relatou que a prevalência da EM na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, atinge números em torno de 27,2 casos para 100.000 habitantes (FINKELSZTEJN et al., 2014). No entanto, a Europa assume a liderança nos casos de incidência mundial. Dados apontam que em toda a Europa, a taxa de prevalência de EM é de cerca de 83 para 100.000 habitantes, e a taxa de incidência média anual é de cerca de 4,3 casos para 100.000 habitantes.

A EM ocorre com maior frequência em mulheres. Estes índices têm aumentado na proporção de 1,4 casos no sexo feminino/1 caso no masculino (ano de 1955) para 2,3 casos no sexo feminino/1 caso no masculino (ano 2000) (PUGLIATTI et al., 2006). Tal aumento da prevalência global em mulheres foi observado em estudos longitudinais e uma justificativa

plausível para explicar esse fenômeno é devido ao aumento da longevidade de pacientes com EM e os avanços no diagnóstico desta doença; e não devido a um aumento do risco global do sexo feminino para a EM (PUGLIATTI et al., 2006; KAMM; UITDEHAAG; POLMAN, 2014). Embora seja uma doença incapacitante, a expectativa de vida em portadores desta doença é reduzida em apenas 7-10 anos (KAMM; UITDEHAAG; POLMAN, 2014).

Uma visão global sobre os índices desta doença pode ser visto no mapa para a EM no mundo, publicado pela Organização Mundial da Saúde em 2008 (figura 4).

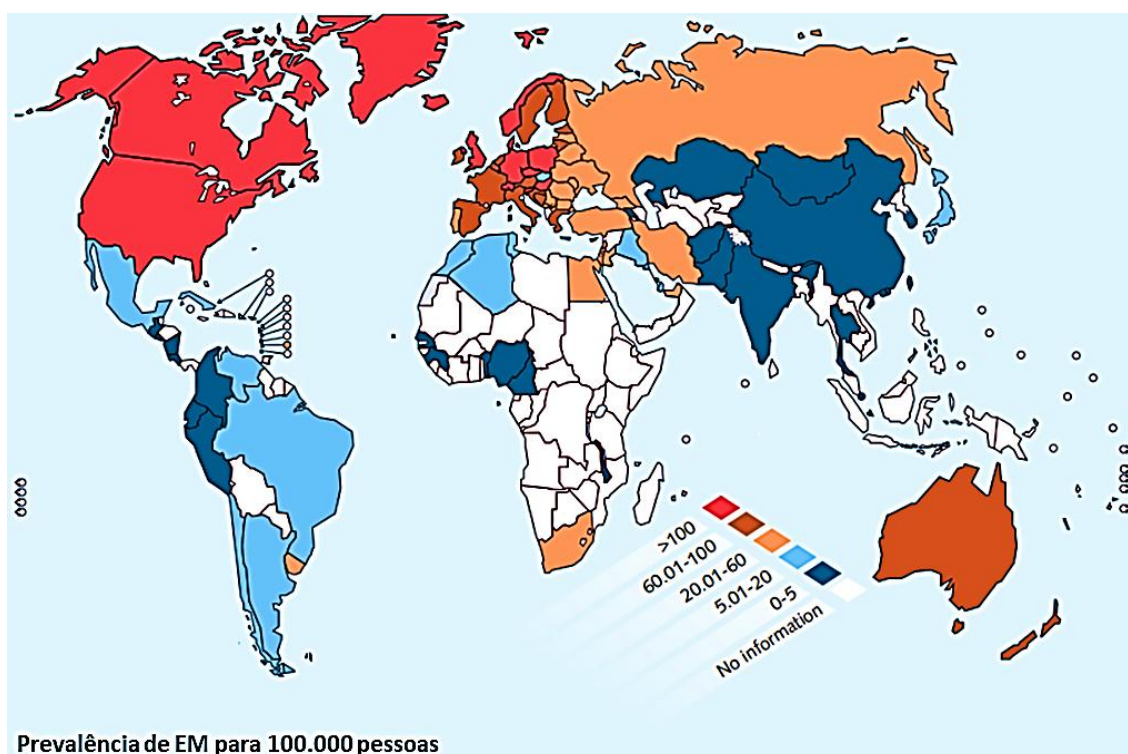


Figura 4 – A geografia da Esclerose Múltipla: Prevalência para 100:000 habitantes

Fonte: Adaptado de (WHO, 2008).

1.5 A patofisiologia da Esclerose Múltipla: O importante papel dos axônios e da bainha de mielina

Para compreender melhor a patofisiologia da EM, é necessário destacar algumas células do sistema nervoso, bem como a sua função. Os oligodendrócitos e as células de Schwann são as responsáveis pela produção da mielina no SNC e SNP, respectivamente. A mielina é uma substância lipídica e está presente na bainha de mielina, estrutura formada por

projeções do citoplasma de oligodendrócitos (figura 5A) e células de Schwann (figura 5B) que rodeiam os axônios dos neurônios. O revestimento destes axônios pela bainha de mielina permite que a condução do impulso nervoso ocorra de maneira saltatória, isto é, a despolarização das membranas e condução do potencial de ação dos axônios ocorrem somente em pequenas porções entre as bainhas de mielina. Estes sítios chamam-se nodos de Ranvier (ver figura 5). As fibras envoltas por mielina são chamadas precisamente mielínicas, enquanto que as fibras que não possuem um revestimento de mielina chamam-se fibras amielínicas e possuem uma condução de impulso mais lenta (LAZZARINI et al., 2004; BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008).

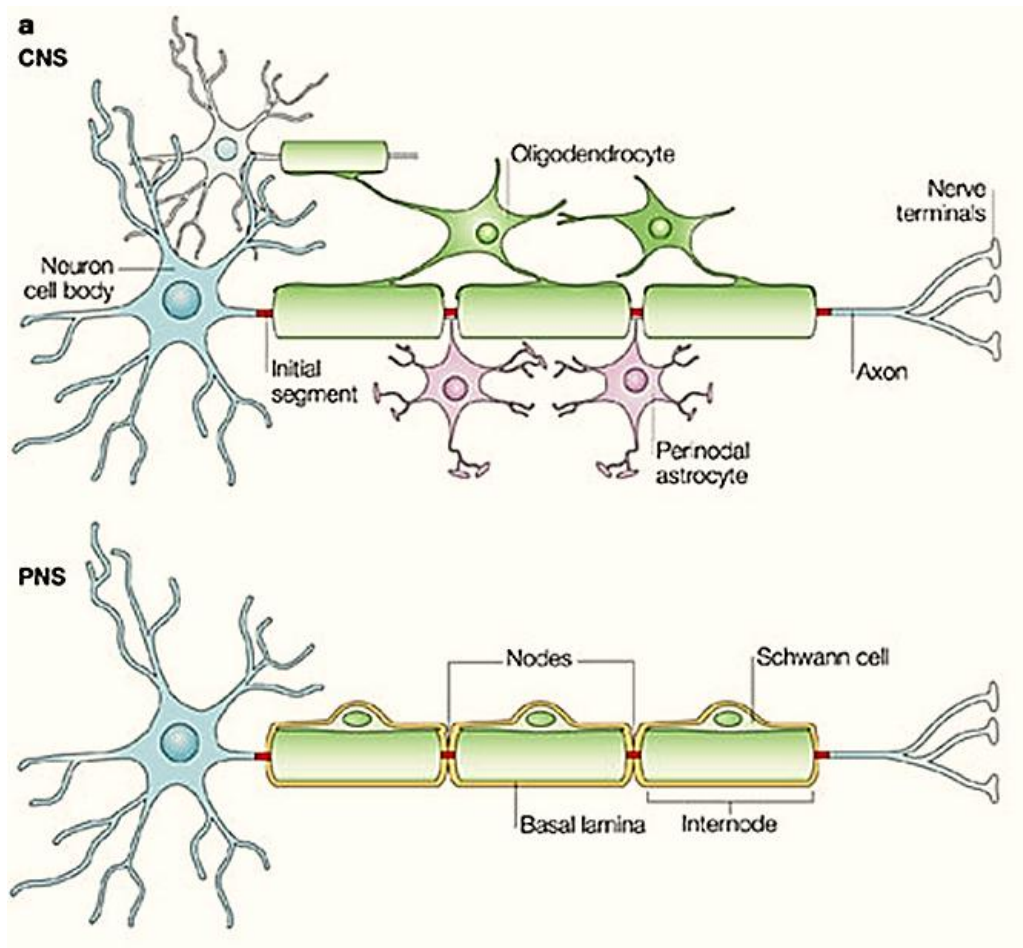


Figura 5 – Bainha de mielina em neurônios do sistema nervoso central (CNS) e sistema nervoso periférico (PNS). Na figura podem ser observados: *neuron cell body* (corpo celular do neurônio), *oligodendrocyte* (oligodendrócitos), *perinodal astrocyte* (astrócitos que fazem comunicação com os neurônios na região dos nodos de Ranvier), *Nodes* (Nodos de Ranvier), *Schwann cell* (células de Schwann), *internode* (espaço entre os nodos de Ranvier que é composto pela bainha de mielina)

Fonte: Retirada da obra de (POLIAK; PELES, 2003).

De fato, o processo de formação de mielina faz parte de um dos maiores passos da evolução dos vertebrados, uma vez que permite a transmissão do impulso nervoso de forma rápida e eficiente integrando funções sensoriais, motoras e cognitivas (LAZZARINI et al., 2004; BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008; YEUNG et al., 2014).

Na figura 6 pode ser observado o axônio (*axon*) de um neurônio (*neuron*) revestido pela bainha de mielina (*myelin sheath*), a qual é formada pelo oligodendrócito ou célula oligodendroglial (*oligodendroglial cell*). Pode-se observar uma representação da infiltração de uma célula T (*T cell*) que atravessa a barreira hematoencefálica (*blood-brain barrier*) para o SNC. As células T em ação conjunta aos macrófagos, ou células apresentadoras de antígenos (*APC*), dão início a eventos biológicos que resultam na liberação de mediadores pró-inflamatórios, produção de espécies reativas e liberação de glutamato. O somatório destas reações culminam em neurotoxicidade e danos sobre os oligodendrócitos e, em seguida, no axônio dos neurônios (STEINMAN; ZAMVIL, 2003). A perda da mielina que reveste os neurônios e a morte de oligodendrócitos são os principais alvos na EM. Tanto a síntese quanto a integridade da mielina é dependente do funcionamento normal dos oligodendrócitos e células de Schwann (SRIRAM, 2011) sendo vital para que ocorra a transmissão do impulso nervoso entre neurônios e seus alvos (SRIRAM, 2011; PEREIRA; LEBRUN-JULIEN; SUTER, 2012).

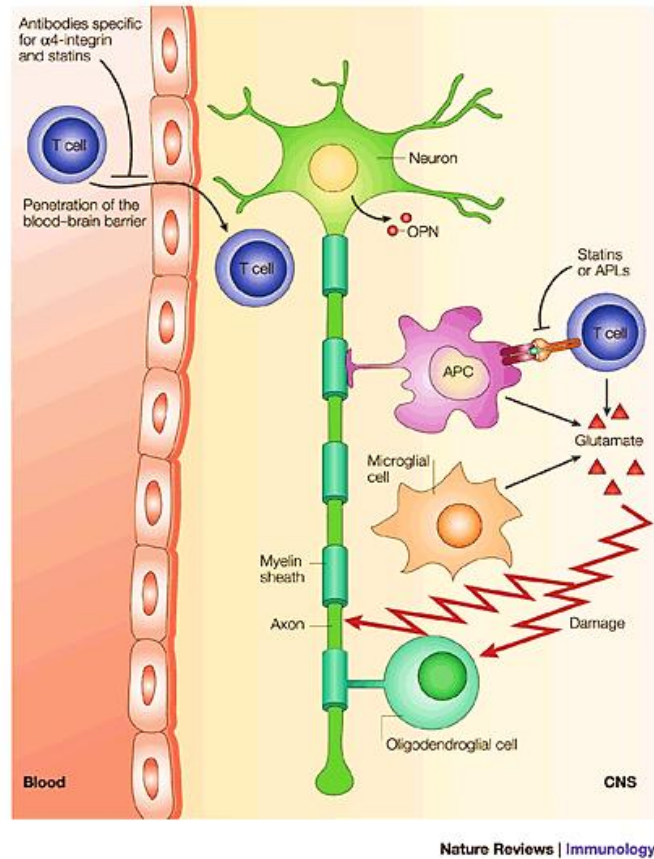


Figura 6 – Etiopatologia da Esclerose Múltipla

Fonte: Retirada da obra de (STEINMAN; ZAMVIL, 2003).

1.6 A enzima Na^+, K^+ -ATPase e a transmissão do impulso nervoso pelo axônios.

Tendo em vista que o processo de inflamação e desmielinização levam a danos axonais, enzimas localizadas nestes sítios tornam-se mais comumente afetadas pela ação de mediadores inflamatórios e produção de espécies reativas. Dentre estas enzimas destaca-se a Na^+, K^+ -ATPase (*Sodium/potassium-exchanging ATPase/EC 3.6.3.9*) que está ancorada na membrana plasmática e desempenha um importante papel na manutenção da homeostase dos eletrólitos intracelulares em todos os tecidos. Esta enzima é responsável pelo transporte ativo que é movido pela hidrólise de moléculas de ATP. Tal transporte restabelece os gradientes de Na^+ e K^+ extra e intracelular e ocorre principalmente nos axônios onde é realizada a transmissão do impulso nervoso (SKOU; ESMANN, 1992). Uma vez que mantêm as concentrações iônicas na normalidade, a Na^+, K^+ -ATPase contribui também para a manutenção do volume e do pH celular, concentrações de Ca^{2+} intracelulares, e transporte de

biomoléculas dependentes das concentrações de Na^+ (LINGREL; KUNTZWEILER, 1994; LINGREL et al., 1994).

Esta enzima apresenta 3 subunidades: α , β e γ . A subunidade α possui uma massa molecular de aproximadamente 113 kDa e 4 isoformas já foram descritas: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$. Na subunidade α encontram-se os sítios de ligação para os íons Na^+ , K^+ e o ATP e também apresenta o sítio alvo para glicosídios cardiotônicos, como o inibidor oubaína (LINGREL; KUNTZWEILER, 1994; LINGREL et al., 1994; KAPLAN, 2002). As diferenças entre as isoformas da subunidade α são mínimas, mas no que diz respeito à sensibilidade a inibidores como a oubaína, as isoformas $\alpha 2$ e $\alpha 3$ são muito mais sensíveis tendo um IC_{50} de 28,4 nM, enquanto que a isoforma $\alpha 1$ apresenta um IC_{50} de 89,4 μM (NISHI et al., 1999b; NISHI et al., 1999a). A subunidade β possui um tamanho de 55 kDa (JORGENSEN; HAKANSSON; KARLISH, 2003) e 3 isoformas: $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$ (LINGREL; KUNTZWEILER, 1994; LINGREL et al., 1994; KAPLAN, 2002). Além disso, a subunidade β exerce um importante papel na estabilização da conformação ótima da subunidade α na membrana plasmática contribuindo para a atividade ATPásica (BEGGAH et al., 1999) e cooperando durante as alterações conformacionais no ciclo reacional da enzima (KAPLAN, 2002; JORGENSEN; HAKANSSON; KARLISH, 2003; HORISBERGER, 2004). A subunidade γ é a menor subunidade da Na^+, K^+ -ATPase apresentando um peso molecular de aproximadamente 12 kDa e atua como alvo modulatório da Na^+, K^+ -ATPase (BEGUIN et al., 1997).

A descoberta da Na^+, K^+ -ATPase foi realizada pelo pesquisador Jens Christian Skou que descreveu a atividade ATPásica desta enzima sobre a influência de cátions em nervos periféricos no ano de 1957 (SKOU, 1957). Esta descoberta rendeu a Skou, no ano de 1997, o prêmio Nobel de Química. Em condições fisiológicas, esta enzima transfere três íons Na^+ para o meio extracelular, dois íons K^+ para o meio intracelular, hidrolisando uma molécula de ATP. Desta forma, após cada despolarização a Na^+, K^+ -ATPase rapidamente promove o efluxo de Na^+ e o influxo de K^+ (KAPLAN, 2002). Uma repolarização rápida da membrana e o reestabelecimento das concentrações desses íons são vitais para a formação de um novo potencial de ação e transmissão de um novo impulso nervoso (BOSTOCK; SEARS, 1978; BOSTOCK; SEARS; SHERRATT, 1983).

Sabe-se que quando os axônios estão desmielinizados, ocorre uma difusão dos canais de sódio (Na_v^+) para regiões além dos nodos de ranvier (WAXMAN; CRANER; BLACK, 2004). A redistribuição destes Na_v^+ pela membrana aumenta o influxo Na^+ durante a condução do impulso aumentando a área de membrana despolarizada. É importante ressaltar que quanto maior for a área de despolarização da membrana, maior será a atividade da

Na^+, K^+ -ATPase e o consumo de ATP para restabelecer as concentrações eletrolíticas. Esta relação mostra o importante papel desta enzima com a transmissão do impulso nervoso pelos axônios (YOUNG et al., 2008).

Quanto a regulação da Na^+, K^+ -ATPase, é sabido que uma diminuição da sua atividade, bem como da sua expressão, prejudica diretamente a sinalização de neurotransmissores comprometendo tanto aprendizado e a memória quanto a atividade locomotora e a ansiedade de ratos (DOS REIS et al., 2002; MOSELEY et al., 2007). Além disso, experimentos *in vitro* mostraram que a inibição da Na^+, K^+ -ATPase pode ocasionar no aumento das concentrações de Ca^{2+} intracelulares (FUJISAWA et al., 1965; XIAO et al., 2002) e causa morte de neurônios e astrócitos (STELMASHOOK et al., 1999; TAKAHASHI et al., 2000; XIAO et al., 2002). Evidências da literatura ainda apontam que ambas atividade e expressão destas enzimas estão relacionadas com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (CHAUHAN; LEE; SIEGEL, 1997; ZHANG et al., 2013; DE LORES ARNAIZ; ORDIERES, 2014; GUTIERRES et al., 2014b). Além disso, devido ao dano axonal presente nos processos de desmielinização, o mesmo efeito também foi observado em pacientes com EM (KURNELLAS et al., 2005; GARAY et al., 2008; YOUNG et al., 2008).

1.7 EM: Manifestações clínicas e progressão da doença

Como visto anteriormente, o sistema imune do portador de EM acaba por destruir a bainha de mielina culminando em danos axonais e na piora da transmissão do impulso nervoso. Tais eventos resultam na inflamação do sistema nervoso, desmielinização, lesão e perda axonal. Acredita-se ser uma doença auto-imune, mas a especificidade para o antígeno da resposta imunitária é desconhecido.

Uma vez que se iniciam os processos de desmielinização, ocorre o aparecimento de múltiplas placas na substância branca encefálica e medular (GOLDENBERG, 2012). Essas lesões levam a deficiência ou perda completa dos impulsos nervosos que resultam no aparecimento das manifestações clínicas, como o comprometimento motor (BONDAN et al., 2006b) visão embaçada, hiperalgesia nos membros superiores e inferiores, cansaço excessivo, fraqueza, ansiedade, depressão e déficits neurológicos irreversíveis (GOLDENBERG, 2012; GUIMARAES; SA, 2012; KIPP; VAN DER VALK; AMOR, 2012).

Durante os primeiros estágios de surto-remissão, a doença é caracterizada por lesões inflamatórias focais ("placas") na substância branca do sistema nervoso. Tais eventos levam a desmielinização primária com variável perda axonal e reatividade de células gliais. As células T auto-reativas ativadas no exterior do SNC, atravessam a barreira hematoencefálica e são reativados por antígenos locais através de células apresentadoras de antígenos. A secreção de citocinas pró-inflamatórias estimula as células microgliais e astrócitos, recrutam células inflamatórias adicionais, e induzem a produção de anticorpos por células plasmáticas. Este processo inflamatório finalmente conduz a danos nos tecidos no interior da placa (BERER et al., 2011). Vários padrões de desmielinização foram distinguidos com base nos mecanismos fisiopatológicos. O córtex cerebral, por exemplo, é comumente afetado em fases iniciais da doença. É observada a presença de inflamação cortical e consequente desmielinização que pode evoluir para a neurodegeneração tecidual. Em nível celular, observa-se redução de neuritos com consequente neurodegeneração axonal e morte oligodendroglial. Ao término do processo, instaura-se a atrofia cortical (LUCCHINETTI et al., 2011; LASSMANN, 2014).

A relação entre a inflamação e a degeneração durante a progressão da EM pode ser vista no estudo de Siffrin e colaboradores (2010) e está representada na figura 7. Pode-se observar no gráfico esquemático que nas fases iniciais, a doença geralmente se caracteriza por sucessivos surtos e remissões com aparecimento de sinais clínicos. Há uma maior frequência de eventos inflamatórios acompanhados de desmielinização da substância branca e dano nos axônios. Nesta etapa é possível uma capacidade tecidual de reparo, no qual há uma remielinização axonal e o desaparecimento das manifestações clínicas. À medida que esses eventos se repetem, há um comprometimento tecidual e a capacidade de recuperação torna-se ineficaz. Inicia-se a fase progressiva secundária onde há o estabelecimento de degeneração tecidual, desmielinização da substância cinzenta e atrofia cerebral. Nesta fase há um aumento progressivo sobre o escore de incapacidades que podem levar à incapacitação do paciente (figura 7).

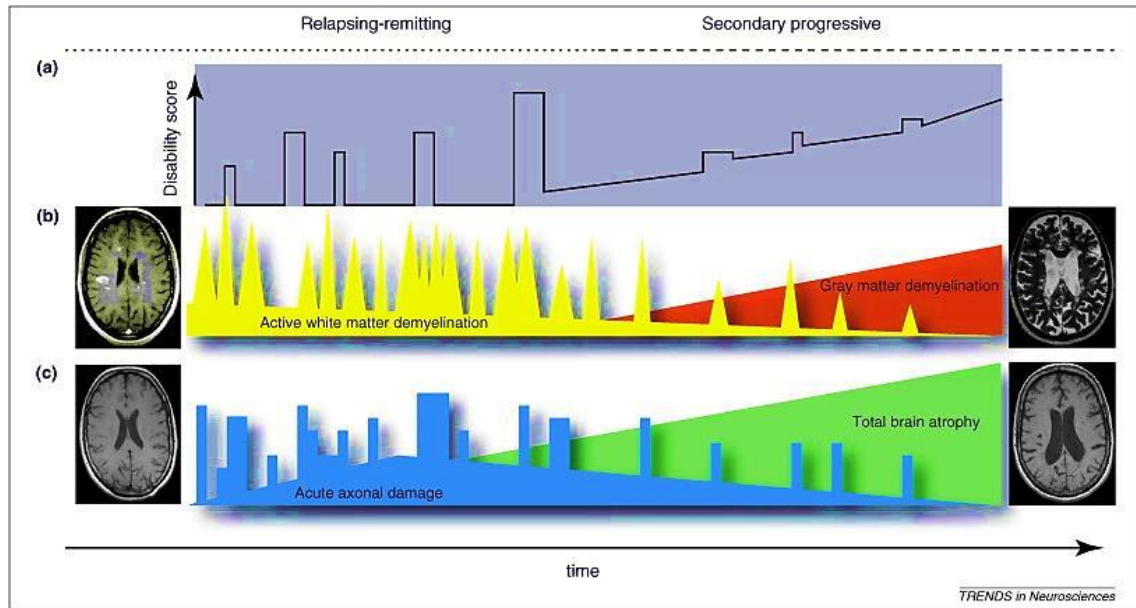


Figura 7 – Relação entre a inflamação e a degeneração durante a progressão da Esclerose Múltipla: Uma visão global sobre surtos e remissões. A) Representa o escore para desabilidades (*disability score*) entre as fases de surto-remissão (*relapsing-remitting*). B) Representa a relação entre a desmielinização da substância branca (*active white matter demyelination*) versus desmielinização da substância cinzenta (*gray matter demyelination*). C) Representa o dano axonal agudo (*acute axonal damage*) versus atrofia cerebral total (*total brain atrophy*)

Fonte: Retirado da obra de (SIFFRIN et al., 2010).

1.8 Brometo de Etídio: Modelo experimental para estudos de desmielinização

O modelo experimental de desmielinização pelo brometo de etídio (BE) permite avaliar alterações neuroquímicas relacionadas tanto à desmielinização quanto a remielinização (BONDAN et al., 2006a; MAZZANTI et al., 2009) e mimetiza mudanças morfológicas, enzimáticas e celulares provenientes da destruição das bainhas de mielina e de danos axonais. Em paralelo, o uso de ratos como modelo animal mimetiza manifestações clínicas e morfológicas semelhantes as encontradas em pacientes com EM. Ratos apresentam o desenvolvimento de vacúolos e placas desmielinizadas no sítio de injeção de BE. Primeiramente ocorre uma desmielinização focal devido a um processo inflamatório com redução na população de oligodendrócitos e conteúdo de mielina. Esta fase mimetiza o surto presente em pacientes com EM (GRACA; BLAKEMORE, 1986; GRACA, 1987; 1988; 1989b; a; GRACA et al., 2001; MAZZANTI et al., 2006; MAZZANTI et al., 2007b; MAZZANTI et al., 2007a; SPANEVELLO et al., 2007; MAZZANTI et al., 2009).

Após a desmielinização, é iniciado o processo de reparação tecidual com consequente remielinização local. Este evento mimetiza a remissão presente em pacientes com EM. Desta

forma, a desmielinização tóxica induzida pelo brometo de etídio reproduz em parte ambas as fases de surto-remissão. Além disso, ratos sujeitos a desmielinização na ponte apresentam uma piora nas habilidades motoras em tarefas comportamentais (como o *Beam walking* e *Foot fault task*) (BECKMANN et al., 2014), e comprometimentos motores são as principais manifestações clínicas apresentadas na EM.

O principal mecanismo da desmielinização do BE ocorre devido as suas propriedades gliotóxicas, que levam a destruição de células gliais preservando os neurônios. Além de oligodendrócitos, os astrócitos também podem ser alvo da toxicidade do BE (BONDAN et al., 2003; BONDAN et al., 2010). O uso da ponte como estrutura alvo para a desmielinização consiste no fato desta estrutura atuar na comunicação entre SNC e SNP, desempenhando importante papel nas funções motoras. Esta estrutura também é uma das mais ricas em mielina e é a quarta estrutura com maior incidência de placas em pacientes portadores de EM (28.6%). Dentre outras estruturas comprometidas estão a medula espinhal e nervo óptico (MINGUETTI, 2001; SKENDER-GAZIBARA et al., 2001).

A injeção de BE (0.1% em salina, 10 µl) na cisterna da ponte induz uma lesão de desmielinização que compromete 1/3 até 1/2 da ponte (BONDAN et al., 2003). Morfologicamente, pode ser observado uma lesão degenerativa em astrócitos e oligodendrocitos após 72 horas de indução (GRACA et al., 2001; BONDAN et al., 2003). Os axônios aparecem desmielinizados ao sexto dia, com um pico de desmielinização que ocorre no sétimo dia pós indução.

1.9 Lipopolissacarídeo (LPS): Modelo experimental para estudos de neuroinflamação

Quando ocorre o estabelecimento de um processo infeccioso muitas vezes este evento induz mudanças no humor, nas emoções e na capacidade de aprendizado e memória. Estas circunstâncias tornaram-se alvos de estudos científicos que buscam uma melhor compreensão sobre a comunicação entre SNC e o sistema imunológico (NGUYEN; JULIEN; RIVEST, 2002; PERRY, 2010; PERRY; TEELING, 2013). Em vista da grande importância da homeostasia do SNC para o funcionamento dos neurônios, o encéfalo possui um sistema complexo e organizado para formar respostas imunes perante infecções ou doenças do sistema nervoso.

Astrócitos e micróglia são células com capacidade fagocítica e representam a primeira linha de defesa contra patógenos invasores, servindo também de sensores especiais para ocorrência de dano tecidual no encéfalo (LITTLE; O'CALLAGHA, 2001; PERRY; TEELING, 2013). Em paralelo, outro sistema complexo e altamente eficiente é a barreira hematoencefálica. Esta estrutura é formada de células endoteliais altamente especializadas, as quais inibem o tráfego de moléculas devido a sua baixa atividade de pinocitose; e difusão de moléculas hidrofílicas, devido a uma elaborada rede de junções de oclusão entre as células endoteliais (CAMPOS-BEDOLLA et al., 2014; HAINSWORTH; OOMMEN; BRIDGES, 2015; STRAZIELLE; GHERSI-EGEA, 2015). Logo, quaisquer alterações que ocorram na integridade da barreira hematoencefálica proporcionam a migração de biomoléculas e leucócitos para dentro do SNC e, como consequência, iniciam-se eventos os quais estão relacionados com a patogênese de doenças auto-imunes, inflamatórias, neurodegenerativas e infecciosas deste sistema (AKTAS et al., 2007; WEISS et al., 2009).

Ao mesmo tempo, citocinas periféricas também podem atuar sobre as funções cerebrais. Mediadores inflamatórios produzidos sistemicamente são capazes de sinalizar informações ao encéfalo por rotas neurais. Neste caso, os receptores específicos do nervo vago, que é a principal via aferente da cavidade torácico-abdominal para o encéfalo, emitem impulsos nervosos até o encéfalo quando estimulados por mediadores inflamatórios. Estes impulsos atingem o núcleo do trato solitário que, por sua vez, sinaliza o sinal a regiões do encéfalo envolvidas com humor e motivação (QUAN; HERKENHAM, 2002). Sinais humorais como IL-1 β , TNF- α e IL-6 são tipicamente pequenos, mas grande demais para atravessar a barreira hematoencefálica (ABBOTT, 2000; ALVAREZ; KATAYAMA; PRAT, 2013).

Existe uma grande correlação entre a ocorrência de processos inflamatórios no sistema nervoso com o desenvolvimento de patologias. Dentre estas se destacam a doença de Alzheimer (HAUSS-WEGRZYNIAK et al., 1998; SHENG et al., 2003; HERBER et al., 2007; LEE et al., 2008; DENG et al., 2014), a doença de Parkinson (HERNANDEZ-ROMERO et al., 2012; RAMSEY; TANSEY, 2014) e, principalmente, a EM (AMEDEI; PRISCO; D'ELIOS, 2012; ELLWARDT; ZIPP, 2014). Em relação a EM, a neuroinflamação é o principal fator que contribui para a progressão e o agravamento do quadro patológico uma vez que leva a um aumento da área desmielinizada e atrofia do tecido encefálico (conforme apresentado na figura 7) (FOX et al., 2000; FOX et al., 2005; SIFFRIN et al., 2010).

O LPS é um componente biologicamente ativo da membrana de bactérias gram-negativas sendo composto por três partes: uma polissacarídica hidrofílica, uma lipídica

hidrofóbica (Lipídeo A) e, por fim, uma região do antígeno-O. A parte lipídeo-A é a fração mais conservada desta endotoxina e é responsável por sua toxicidade e capacidade de estimulação do sistema imune (LU; YEH; OHASHI, 2008). O reconhecimento dos patógenos é uma das propriedades mais básicas e importantes do sistema imune que possui um grupo de receptores específicos, como os *Toll Like Receptors* (TLR). Esses receptores são estimulados por estruturas presentes em bactérias, vírus e fungos e desencadeiam a ativação de uma via de sinalização comum que culmina no aumento da transcrição de NF- κ B (TAKEDA; AKIRA, 2003; AKIRA; TAKEDA, 2004). A ativação do NF- κ B leva a alterações na expressão gênica, tais como regulação positiva da expressão de moléculas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α (LU; YEH; OHASHI, 2008) e já tem sido sugerido como alvo terapêutico central para o tratamento da EM (SRINIVASAN; LAHIRI, 2015).

Um dos principais usos de LPS no meio científico é para gerar respostas inflamatórias *in vitro* e *in vivo*. A neuroinflamação induzida pelo LPS promove a liberação de citocinas, prostanoídes e espécies reativas. O somatório destes eventos deletérios culminam em perda de neurônios hipocampais, piora no aprendizado e na memória (HENRY et al., 2008; ABRAHAM; JOHNSON, 2009; GRANGER et al., 2013; FAN et al., 2014; FRANCOIS et al., 2014) e depressão (MELLO et al., 2013). Além disso, os TLR4 tem sido sugeridos como alvos terapêuticos para a EM uma vez que respostas inapropriadas (hiperestimulação) destes receptores implicam no desenvolvimento de doenças autoimunes e na progressão da EM (MARTA, 2009; GAMBUZZA et al., 2011; MIRANDA-HERNANDEZ; BAXTER, 2013). Relatos também apontam que um estado crônico induzido pelo LPS contribui para formação do peptídeo β -amilóide (LEE et al., 2008) e para o desenvolvimento da doença de Alzheimer (MIKLOSSY, 2008; JAEGER et al., 2009). Em virtude disso, a ativação da micróglia, principal responsável pela produção e liberação de mediadores inflamatórios no SNC, tem sido sugerida como um importante sensor para eventos patológicos cerebrais. Sendo assim, agentes que atuam na redução na sua imunoreatividade são capazes de contribuir para o controle da neuroinflamação. Desta forma, a descoberta de agentes que modulem este processo pode promover uma melhora no prognóstico de processos patológicos associados a neuroinflamação, como por exemplo, a progressão de doenças neurodegenerativas (ALLAN; ROTHWELL, 2001; 2003) e a evolução da EM (CHEN et al., 2011; GARRIDO-MESA; ZARZUELO; GALVEZ, 2013).

1.10 Tratamento para EM: podemos nos permitir um certo otimismo?

A EM é uma doença que não possui cura definida e nenhum fármaco é capaz de impedir o desenvolvimento e progressão desta doença de maneira totalmente eficaz. O foco da terapia na EM está concentrado no uso de agentes imunomoduladores como a ciclofosfamida e o IFN- β (TILBERY et al., 2000b; TILBERY et al., 2000a; NEUHAUS; ARCHELOS; HARTUNG, 2003). A ciclofosfamida interfere na síntese e função do DNA e parece alterar o perfil da resposta imunológica na EM reduzindo a produção de interleucinas (TAKASHIMA et al., 1998). A utilização crônica pode levar ao desenvolvimento de neoplasias e suscetibilidade a infecções (SCHLUEP; BOGOUSSLAVSKY, 1997). Em relação ao IFN- β , acredita-se que este tenha um efeito inibitório sobre a proliferação linfocitária e que desvie a produção de citocinas na direção de um perfil anti-inflamatório e reduza a migração das células T (YONG et al., 1998).

A imunossupressão e redução de células T ativadas são o foco das terapias, pois quando alcançam o SNC reconhecem antígenos específicos presentes nos astrócitos, ou células da micróglia, e são desta maneira reativada produzindo mediadores pró-inflamatórios que levam a desmielinização. No entanto, relatos do uso destes fármacos mostraram efeitos colaterais como nefrotoxicidade e neurotoxicidade (SMITH; FRANKLIN, 2001; RUIZ-PENA; IZQUIERDO-AYUSO, 2002; ROSENDAL et al., 2005).

A metilprednisolona intravenosa (MPIV) seguida de prednisona constituem a primeira escolha para o tratamento dos surtos devido à facilidade de obtenção e à redução dos custos. No entanto os resultados e o benefício ainda não são totalmente eficazes (BARNES et al., 1997; SELLEBJERG et al., 1998; SHARRACK et al., 2000). Além disso, o tratamento crônico com prednisona oral é contra-indicado, pois não altera a progressão neurológica ou o número de surtos e pode contribuir para a piora do quadro (MILLAR et al., 1967).

1.11 Justificativa

Tendo em vista que a EM é uma doença que não possui cura, e que os tratamentos convencionais não oferecem uma resposta imediata totalmente satisfatória, é de vital importância que o meio científico busque evidências de novos agentes que contribuam na

qualidade de vida e no controle dos surtos nestes pacientes. A neuroinflamação e a desmielinização são condições patológicas de significativa prevalência e morbidade, e promovem uma disfunção encefálica que resulta na incapacitação destes pacientes. Dentre estes destacam-se uma série de desabilidades motoras, piora da cognição, ansiedade e depressão (MINA et al., 2014; SCHWALM et al., 2014).

Na farmacologia existente, é comum o uso de monoterapias para o tratamento da desmielinização e neurodegeneração. Talvez, esta possa não ser considerada a forma mais eficaz para resolver a heterogeneidade e complexidade da desmielinização ou mesmo o desenvolvimento de um processo de inflamação do sistema nervoso. A este respeito, nutracêuticos ou fitonutrientes podem ser destinados para tratar simultaneamente diferentes alvos terapêuticos, com o mínimo de efeitos adversos possíveis e ainda representar uma terapia coadjuvante que potencialize a monoterapia clássica com uso de fármacos.

Um recente achado mostrou evidências promissoras fazendo a associação entre as antocianinas e a capacidade de mielinização de células. Conforme apresentado por Stetter e colaboradores (2013) ingredientes presentes no vinho tinto, dentre eles as antocianinas, foram capazes de promover a mielinização *in vitro* usando um modelo para SNP (STETTNER et al., 2013). Neste mesmo estudo, houve um aumento no conteúdo de mielina bem como no número de células de Schwann e de internodos quando adicionado os ingredientes do vinho. Embora os mecanismos de ação das antocianinas não estejam bem definidos, as evidências sobre este fitonutriente o tornam um importante agente terapêutico que merece ser investigado. Tomando posse deste conceito, o presente estudo teve o propósito de criar uma estreita interação entre o consumo de antocianinas, um fitonutriente presente na dieta, e os efeitos deletérios que a neuroinflamação e a desmielinização são capazes de causar no sistema nervoso de roedores. Desta forma, neste estudo foi investigado o efeito protetor das antocianinas diante dos efeitos deletérios em modelos experimentais que mimetizam processos patológicos encontrados na EM. Através deste estudo, espera-se encontrar evidências de que as antocianinas possam atuar como um composto bioativo coadjuvante contra processos inflamatórios e desmielinizantes observados na EM.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar um possível efeito protetor das antocianinas sobre parâmetros comportamentais, morfológicos, neuroquímicos e inflamatórios em modelos experimentais de neuroinflamação e desmielinização em roedores.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Verificar a capacidade das antocianinas em neutralizar espécies reativas em modelos de indução de estresse oxidativo e nitrosativo *in vitro*.
- 2) Verificar o efeito protetor das antocianinas sobre marcadores pró-inflamatórios e de estresse oxidativo e nitrosativo em um modelo experimental de neuroinflamação e de desmielinização em roedores.
- 3) Investigar alterações morfológicas nas populações neuronais no encéfalo de roedores tratados com antocianinas e submetidos a neuroinflamação ou desmielinização experimental.
- 4) Investigar a presença de infiltrados inflamatórios no encéfalo de roedores tratados com antocianinas e submetidos a neuroinflamação ou desmielinização experimental.
- 5) Investigar a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase e Ca^{2+} -ATPase em roedores tratados com antocianinas e submetidos a neuroinflamação ou desmielinização experimental.
- 6) Verificar, através de estudos histoquímicos, se as antocianinas previnem a desmielinização induzida pelo brometo de etído na ponte de ratos.
- 7) Verificar através de estudos imunohistoquímicos se as antocianinas reduzem a imunoreatividade microglial induzida pelo lipopolissacarídeo no hipocampo de camundongos.
- 8) Verificar se as antocianinas protegem a memória de camundongos submetidos a neuroinflamação experimental induzida por lipopolissacarídeo.

RESULTADOS

3.1 Artigo 1: Publicado.

Título:

“Anthocyanins suppress the secretion of proinflammatory mediators and oxidative stress, and restore ion pump activities in demyelination”.

Dados sobre o Periódico:

The Journal of Nutritional Biochemistry

ISSN 0955-2863

Fator de Impacto 4.592

Qualis CAPES A2

Endereço Eletrônico <http://www.journals.elsevier.com/the-journal-of-nutritional-biochemistry/>





Anthocyanins suppress the secretion of proinflammatory mediators and oxidative stress, and restore ion pump activities in demyelination

Fabiano B. Carvalho^{a,*}, Jessié M. Gutierrez^b, Crystiani Bohnert^a, Adriana M. Zago^a, Fátima H. Abdalla^b, Juliano M. Vieira^b, Heloisa E. Palma^c, Sara M. Oliveira^b, Roselia M. Spanevello^d, Marta M. Duarte^b, Sonia T.A. Lopes^c, Graciane Aiello^c, Marta G. Amaral^e, Ney Luis Pippi^{a,c}, Cinthia M. Andrade^{a,b,c,*}

^aPrograma de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Setor de Bioquímica e Estresse Oxidativo do Laboratório de Terapia Celular, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria RS 97105-900, Brasil

^bPrograma de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas; Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria RS 97105-900, Brasil

^cPrograma de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Pequenos Animais, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria RS, 97105-900, Brasil

^dPrograma de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Capão do Leão, Pelotas RS 96010-900, Brasil

^ePrograma de Pós Graduação em Biotecnologia, Unidade de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Capão do Leão, Pelotas RS 96010-900, Brasil

Received 22 April 2014; received in revised form 9 October 2014; accepted 13 November 2014

Abstract

The aim of this study was to investigate the protective effect of anthocyanins (ANT) on oxidative and inflammatory parameters, as well as ion pump activities, in the pons of rats experimentally demyelinated with ethidium bromide (EB). Rats were divided in six groups: control, ANT 30 mg/kg, ANT 100 mg/kg, EB (0.1%), EB plus ANT 30 mg/kg and EB plus ANT 100 mg/kg. The EB cistern pons injection occurred on the first day. On day 7, there was a peak in the demyelination. During the 7 days, the animals were treated once per day with vehicle or ANT. It was observed that demyelination reduced Na⁺,K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase activities and increased 4-hydroxynonenal, malondialdehyde, protein carbonyl and NO₂ plus NO₃ levels. In addition, a depletion of glutathione reduced level/nonprotein thiol content and a decrease in superoxide dismutase activity were also seen. The dose of 100 mg/kg showed a better dose–response to the protective effects. The demyelination did not affect the neuronal viability but did increase the inflammatory infiltrate (myeloperoxidase activity) followed by an elevation in interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α and interferon- γ levels. ANT promoted a reduction in cellular infiltration and proinflammatory mediators. Furthermore, ANT restored the levels of IL-10. Luxol fast blue staining confirmed the loss of myelin in the EB group and the protective effect of ANT 100 mg/kg. In conclusion, this study was the first to show that ANT are able to restore ion pump activities and protect cellular components against the inflammatory and oxidative damages induced by demyelination.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Anthocyanins; ATPases; Ethidium bromide; Multiple sclerosis; Neuroinflammation; Oxidative stress

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the nervous system that predominately affects young adults, and the degeneration of demyelinated axons is a major cause of the irreversible neurological decline in MS [1,2]. The loss of myelin and

the death of oligodendrocytes lead to the impaired neurotransmission of axons because the myelin sheath permits that the conduction of a nervous impulse occurs quickly and efficiently by nervous cells [3–5]. Furthermore, demyelination increases the axon's susceptibility to oxidative stress and inflammatory damage because myelin also plays an important role in axonal protection [6,7].

Na⁺,K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase are enzymes extensively studied for their roles as maintainers of electrolyte and fluid balance gradients in all mammals. Na⁺,K⁺-ATPase uses the energy from adenosine triphosphate (ATP) hydrolysis to the vectorial transport of Na⁺ and K⁺ across the plasma membrane [8,9]. This creates an electrochemical gradient and maintains the membrane potential, which is essential for depolarization and the transmission of electrical impulses by axons and contributes to the uptake of Na⁺-dependent molecules [10–12]. Ca²⁺-ATPase also displays ATP-dependent activity, and its role is to regulate intracellular Ca²⁺ (iCa²⁺)

* Correspondence to: F.B. Carvalho, Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Setor de Bioquímica e Estresse Oxidativo do Laboratório de Terapia Celular, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS 97105–900, Brasil. Tel./fax: +55 55 3220 9557.

** Correspondence to: C.M. Andrade, Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Setor de Bioquímica e Biologia Molecular do Laboratório de Terapia Celular, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS 97105–900, Brasil. Tel./fax: +55 55 3220 9557.

E-mail addresses: fabisecco@yahoo.com.br (F.B. Carvalho), cmelazzomazzanti@gmail.com (C.M. Andrade).

concentrations. This enzyme contributes to the signaling pathways triggered by this second messenger and protects cells from excitotoxic damage mediated by elevated iCa^{2+} levels [13,14]. Evidence from the literature supports a decrease in both the activity and the expression of these enzymes in the development of axonal loss and MS [15–17].

The traditional therapies for MS cannot effectively prevent the chronic and irreversible progression of this disease, and the discovery of therapeutic agents that prevent the destruction of the myelin sheaths or accelerate the process of remyelination and repair tissue has become indispensable. The use of phytonutrients for the prevention and/or treatment of neurodegenerative diseases has been widely investigated in identifying natural compounds that act as coadjuvant treatments for these diseases [18–20]. Phytonutrients that have antioxidant and anti-inflammatory properties have major therapeutic potential because these factors have an important role in the development of a number of neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease and MS [21–23].

Anthocyanins (ANT) are phytonutrients that have phenolic groups in their structure and have been widely studied due to the antioxidant and neuroprotective properties [24–26]. It has been shown that ANT are effective scavengers of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species [27,28]; ANT are capable of restoring ATP levels in models that lead to the depletion of energy [29] and suppress the migration of immune cells and the production of proinflammatory cytokines [30–32]. In addition, it has recently been reported that wine compounds, including ANT, promoted myelination in an *in vitro* mouse model of the peripheral nerve system [33].

Although the mechanisms of action of ANT are not well defined, investigating the properties of this phytonutrient is of great significance because it is a natural compound found in fruits and vegetables and is present in the human diet in many countries. Moreover, studies from our group have shown that other natural antioxidants possess beneficial effects on demyelination induced by ethidium bromide (EB) in rats [34–37]. Considering that MS is an inflammatory demyelinating disease accompanied by excitotoxic events that lead to an impairment in neurotransmission and the production of ROS and proinflammatory mediators, we investigated whether ANT are able to prevent the deleterious effects induced by demyelination in the pons in rats.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB); EB; malondialdehyde tetrabutylammonium salt (MDA); 2-thioarbutic acid (TBA); epinephrine bitartrate salt; reduced L-glutathione; ouabain octahydrate; adenosine triphosphate disodium salt hydrate; vanadium (II) chloride; sulfanilamide; N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride; acetonitrile; Coomassie brilliant blue G; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; 4-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide and glycine were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Commercial kits for interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- α and interferon (IFN)- γ were purchased from eBioscience (San Diego, CA, USA). Commercial kit for 4-hydroxynonenal (HNE-Hs) was purchased from Cell Biolabs, Inc. (San Diego, CA, USA). For the histological procedures, paraffin, formaldehyde, ethanol, acetic acid, xylol and hematoxylin-eosin were obtained from Merck (Rio de Janeiro, Brazil). Cresyl violet acetate and Luxol fast blue (LFB) were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Anthocyanins were extracted and purified from grape skin and were commercially available from Christian Hansen A/S (Cod. no. AC12-RWSP). This product is soluble in water and ethanol. AC12-RWSP has >15% total ANT content, among which are malvidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside, delphinidin-3-glucoside, petunidin-3-glucoside, pelargonidin-3-glucoside and peonidin-3-glucoside as determined by high-performance liquid chromatography. All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of highest purity.

2.2. Animals

Male Wistar rats (3 months old) weighing 300–350 g were used in the study. The animals were maintained in the Central Animal House of the Federal University of Santa Maria in colony cages at an ambient temperature of 23°C \pm 2°C and relative humidity of 45%–55% with 12-h light/dark cycles. The animals had free access to a

standard rodent pellet diet and water *ad libitum*. All procedures were carried out according to the National Institutes of Health's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior's recommendations for animal care. This work was approved by the ethical committee of the Federal University of Santa Maria (protocol number 23081.005466/2011-13).

2.3. *In vitro* experiments

2.3.1. Induction of oxidative/nitrosative stress in pons homogenate

The pons was dissected and homogenized in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, on ice. Then, the homogenate was centrifuged at 800g for 10 min at 4°C. The supernatant was collected and used for the *in vitro* experiments. The protein content was adjusted between 1.5 and 2 mg/ml. The homogenate was incubated in the dark for 1 h at 37°C with 1 mM sodium nitroprusside (SNP) or 4 mM hydrogen peroxide (H_2O_2) in the presence or absence of ANT (range, 1–100 μ g/ml). After incubation, the reaction medium was used for the analysis of MDA, protein carbonyl and nitrate plus nitrite content.

2.3.2. Reduction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazilo (DPPH)

The antioxidant activity (radical scavenging activity) was measured using the stable DPPH radical, as previously described [38]. Quercetin (Sigma Aldrich, purity 99.9%) was used as a positive control. Each tested extract (2.5 ml) at various concentrations (1–150 μ g/ml) in methanol was mixed with 1.0 ml of DPPH (0.3 mM in 95% ethanol). The absorbance was measured at 518 nm (SPECTRO UV/VIS; QUIMIS) after 30 min. The concentration of DPPH was calculated using the following equation:

$$DPPH \text{ scavenger effect} = \frac{[\text{Abs control} - \text{Abs sample}]}{[\text{Abs control}]} \times 100.$$

2.4. Experimental protocol

2.4.1. Surgical procedure

For the surgical procedure, the rats were anesthetized with 4% isoflurane in 100% O_2 , and the anesthesia was maintained during the surgery with 1.5%–2.5% isoflurane breathing spontaneously via facemask. After the frontal-parietal-occipital area was shaved, antiseptic with 2% iodine solution was carried out. With the aid of a roof motor for orthodontic use and drill number 2, a hole was made 0.85 cm to the right of the bregma until the duramater was exposed. With the use of a Hamilton syringe with a removable needle of 26 caliber, the solutions were injected in the cistern pons (basal), which is an enlargement of the subaradnoid space on the ventral surface of the pons. Ten microliters of 0.1% EB was injected in the animals in the EB, EB plus ANT30 and EB plus ANT100 groups, and the same volume of 0.9% saline solution was injected in the animals from the control, ANT30 and ANT100 groups. The duramater was left open, and the skin, together with the remainder of the subcutaneous tissue, was sutured with a 4.0 nylon thread. In all treatments studied, 10 animals from each group were sacrificed 7 days after the surgical procedure, which consisted of isoflurane anesthesia administration, and the pons and the blood were collected for the subsequent biochemical assays and histological analyses. This experimental protocol was developed in the surgical block at the Veterinary Hospital of the Federal University of Santa Maria and has been standardized by our group based on previously published studies [34,39–43].

2.4.2. Experimental demyelination with EB

The experimental model of demyelination employed in this study was based on the gliotoxic properties of EB that induce primary demyelination on the destruction of glial cells, especially oligodendrocytes and astrocytes [44,45]. The demyelination caused by EB in the pons of rats was previously established by our research group [40,44,46]. The pons acts in the communication between the central nervous system (CNS) and the peripheral nervous system and plays an important role in motor functions. This structure has the fourth highest incidence of demyelination in MS (28.6%), which also affects other structures rich in myelin, such as the optic nerve and the spinal cord [47,48]. Given that these structures are more susceptible to demyelination, the most frequent clinical manifestations in individuals with MS are blurred vision and motor impairment. Based on this evidence, the pons was the target structure chosen for this study.

2.4.3. Treatment

Injections of EB (0.1% saline, 10 μ l) into the cistern pons (basal) induce demyelination lesions that compromise one third to one half of the pons [45]. Degenerative lesions in astrocytes and oligodendrocytes appear after 72 h of induction [45,46]. Demyelinated axons appear after the sixth day of injection, and the peak of demyelination occurs at 7 days postinjection. The rats were treated by gavage with ANT (30 and 100 mg/kg body weight) during this period (approximately 10 a.m.). The dose of ANT was chosen on the basis of protocols developed by our group (data not published) and previous studies that indicated neuroprotection [29,49–51]. The control groups received only vehicle (2-ml/kg daily gavage of saline for 7 days).

The Wistar rats were randomly distributed into six groups (10 animals per group): control, ANT 30 mg/kg, ANT 100 mg/kg, EB, EB plus ANT 30 mg/kg and EB plus ANT 100 mg/kg. ANT and EB were dissolved in saline.

2.5. Histopathological assessment

Perfusion and fixation of the brain were performed through transcardiac perfusion with 4% paraformaldehyde (in 0.9% sodium chloride and 4% sucrose from

Sigma-Aldrich, Brazil), as previously described [52,53]. Frozen brains were sectioned (30- μ m coronal sections) using a cryostat Leica CMI850 (Leica Microsystems, German), and the sections were mounted on slides coated with 2% gelatin plus 0.08% chromalin (chromium and potassium sulfate, from Sigma-Aldrich, Brazil), allowed to dry at room temperature and stored at -20°C until use. The neuronal morphology in hippocampal sections was evaluated by cresyl violet staining of Nissl bodies, as previously described [54]. Briefly, the sections were incubated for 10 min with cresyl violet solution (0.5% in acetate buffer). The sections were then washed twice with acetate buffer, twice in 100% ethanol, cleared with xylene and mounted with DPX medium (Sigma-Aldrich, Brazil).

The pons caudal specimen was fixed in 4% paraformaldehyde and embedded with paraffin, and sections approximately 5 μ m thick were excised, followed by hematoxylin and eosin (H&E) for morphology and a Klüver–Barrera method for myelin staining. In the Klüver–Barrera technique, LFB was used to stain the myelinated axons [55].

2.6. Sample preparation for biochemical parameters

The animals were anesthetized and then euthanized, and the blood was collected by cardiac puncture. The brain was removed, and the pons was separated. Next, the pons was placed in a solution of 10 mM Tris–HCl and 0.1 mM EDTA, pH 7.4, on ice. The brain structure was homogenized in a glass potter in Tris–HCl solution [56]. An aliquot of the homogenate was separated. After centrifugation at 1500g at 4°C for 15 min, aliquots of the supernatant were stored at -80°C until the biochemical analyses. The collected blood was centrifuged at 3500 rpm for 10 min to obtain the serum.

2.7. Enzymatic assays

2.7.1. Determination of $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase activity in the pons

$\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -ATPase activity was measured in the pons supernatant as previously described [57] with minor modifications [58]. Briefly, the assay medium consisted of (in mM) 30 Tris–HCl buffer (pH 7.4), 0.1 EDTA, 50 NaCl, 5 KCl, 6 MgCl_2 , and 100 μg of protein in the presence or absence of ouabain (4 mM) in a final volume of 200 μl . The reaction was started by the addition of ATP to a final concentration of 3 mM. After 30 min at 37°C , the reaction was stopped by the addition of 50 μl of 50% (w/v) TCA. Saturating substrate concentrations were used, and the reaction was linear with protein and time. Appropriate controls were included in the assays for the nonenzymatic hydrolysis of ATP. The amount of inorganic phosphate (Pi) released was quantified colorimetrically, as previously described [59], using KH_2PO_4 as the reference standard. The absorbance was measured at 630 nm. The specific $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-insensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain) and was expressed in nmol of Pi/mg of protein/min.

Ca^{2+} -ATPase activity was measured in the pons supernatant as previously described [60] with minor modifications [61]. Briefly, the assay medium consisted of (in mM) 30 Tris–HCl buffer (pH 7.4), 0.1 EGTA, 6 MgCl_2 , and 100 μg of protein in the presence or absence of 0.4 CaCl_2 in a final volume of 200 μl . The reaction was started by the addition of ATP to a final concentration of 3 mM. After 60 min at 37°C , the reaction was stopped by the addition of 50 μl of 50% (w/v) TCA. Saturating substrate concentrations were used, and the reaction was linear with protein and time. Appropriate controls were included in the assays for the nonenzymatic hydrolysis of ATP. The amount of Pi released was quantified colorimetrically, as previously described [59], using KH_2PO_4 as the reference standard. The absorbance was measured at 630 nm. The Ca^{2+} -ATPase activity was determined by subtracting the activity measured in the presence of Ca^{2+} from that determined in the absence of Ca^{2+} (no added Ca^{2+} plus 0.1 mM EGTA) and was expressed in nmol of Pi/mg of protein/min.

2.7.2. Determination of superoxide dismutase (SOD) activity

The SOD activity was assessed in the pons homogenate. The method was based on the reaction autooxidation of adrenaline to adrenochrome. The intermediate in this reaction is superoxide, which is scavenged by SOD. The results were expressed as the U SOD/mg of protein. One SOD unit was defined as the enzyme amount necessary to cause 50% inhibition of adrenaline autooxidation [62].

2.8. Quantification of oxidative stress biomarkers

2.8.1. Markers of lipid peroxidation

Markers of lipid peroxidation in rat pons were determined by quantification of HNE-His and MDA levels. HNE-His was detected by immunoassay according to the instructions of the supplier (Cell Biolabs, Inc.), and MDA levels were measured by thiobarbituric acid reactive species method. The contents of MDA levels were obtained from the pons homogenate by methods described previously [63] with a few modifications [64]. In short, the reaction mixture contained 200 μl of pons homogenate or standard (MDA 0.03 mM), 200 μl of 8.1% sodium dodecylsulfate (SDS), 750 μl of acetic acid solution (2.5 M HCl, pH 3.5) and 750 μl of 0.8% TBA. The mixtures were heated at 95°C for 90 min. After centrifugation at 1700g for 5 min, the absorbance was measured at 532 nm. The MDA tissue levels were expressed as μmol MDA/mg of protein.

2.8.2. Assay of NO plus NO₂ (NO_x)

For NO_x determination, an aliquot was homogenized (1:1) in 200 mM ZnSO_4 and acetonitrile. The homogenate was then centrifuged at 16,000g for 30 min at 4°C , and the supernatant was separated for the analysis of NO_x content as previously described [65].

Nitrite and nitrate solutions were used as the reference standards. NO_x concentrations were determined by the absorbance at 570 nm and were expressed as μmol /mg of protein.

2.8.3. Carbonyl proteins

Measurement of total protein carbonyl content was determined by the method described by Yan et al. (1995) [66] and adapted for brain tissue by Oliveira et al. (2004) [67]. Briefly, pons homogenates were adjusted to 0.8 mg/ml of protein in each sample, and 500- μl aliquots were mixed with 0.1 ml 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH, 10 mM) or 0.1 ml HCl (2 M). After incubation at room temperature for 1 h in a dark environment, 250 μl of denaturing buffer (150 mM of sodium phosphate buffer, pH 6.8, containing 3% SDS), 1 ml heptane (99.5%) and 1 ml ethanol (99.8%) were added sequentially and mixed under vortex agitation for 40 s and centrifuged for 15 min. Afterwards, protein isolated from the interface was washed twice with 1 ml ethyl acetate/ethanol 1:1 (v/v) and suspended in 500 μl ml of denaturing buffer. Each DNPH sample was read at 370 nm in a Hitachi U-2001 spectrophotometer against the corresponding HC sample (blank), and total carbonylation was calculated using a molar extinction coefficient of $22,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, as described by Levine et al. (1990) [68].

2.8.4. Nonprotein thiols (NPSH)

Tissue NPSH were determined as previously described [69]. Briefly, the supernatant was diluted (1:1) with 10% TCA, homogenized and centrifuged at 2000g for 10 min. Subsequently, the supernatant was incubated with 10 mM DTNB in a final volume of 2 ml, and the absorbance was read at 412 nm. A cysteine solution was used as the reference standard. NPSH were expressed as μmol SH/mg of tissue.

2.8.5. Glutathione reduced level (GSH)

GSH was determined in the pons supernatant as previously described [69]. Aliquots of the supernatant adjusted to 1 mg/ml of protein content (0.1 ml) were added to a phosphate buffer 300 mM (0.85 ml), pH 7.4, and the reaction was read at 412 nm after the addition of 10 mM DTNB (0.05 ml). The results were expressed as μmol of GSH/mg of protein.

2.9. Biochemical parameters

Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities and creatine and urea levels were measured in the serum in a semiautomatic analyzer (TP Analyzer Plus, Thermoplate, China) using commercial kits (Labtest/Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brazil). All tests were carried out in triplicate.

2.10. Inflammatory cytokines

The cytokine quantification in the pons was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercial kits for IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ (eBioscience, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Briefly, 96-well microplates were sensitized with the primary antibody at room temperature for 30 min, and then the sample was added and incubated (37°C for 30 min). After washing, the secondary antibody conjugated with peroxidase was added and incubated. The presence and concentration of the cytokines were determined by the intensity of the color measured by spectrometry in a micro ELISA reader. We determined the intraassay and interassay coefficients of variation as follows: IL-1 β (5.4% and 5.9%), IL-6 (5.6% and 5.8%), IL-10 (5.3% and 5.7%), TNF- α (5.4% and 5.9%) and IFN- γ (4.7% and 5.2%).

2.11. Leukocyte infiltration markers

To estimate the inflammatory cell infiltration in the pons, the samples were collected, and the activities of myeloperoxidase (MPO) and *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase), which are markers of neutrophil and macrophage infiltration, respectively, were determined [70–72]. First, the samples were homogenized in Tris–HCl buffer (10 mM, pH 7.4) and EDTA (0.1 mM) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide and centrifuged at 16,000g at 4°C for 20 min; the supernatant was then collected. For the MPO activity measurement, 10 μl of supernatant was added to 200 μl of acetate buffer (200 mM, pH 5.4) and 20 μl of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (18.4 mM) in a 96-well plate and incubated at 37°C for 3 min in duplicate. To stop the reaction, the microplates were incubated in an ice bath, and 30 μl of acetic acid was added. The color formed was assessed at 630 nm.

For the measurement of NAGase activity, 25 μl of the supernatant was incubated with 25 μl of 4-nitrophenyl-*N*-acetyl- β -D-glucosaminide (2.24 mM) and 100 μl of citrate buffer (50 mM, pH 4.5) at 37°C for 1 h. After incubation, 100 μl of glycine buffer (0.2 mM, pH 10.4) was added to stop the reaction and to allow for the development of color; it was measured at 405 nm.

The absorbance of all reactions was measured in a Fisher Biotech Microkinetics Reader BT 2000 microplate reader. The values are expressed as the optical densities corrected for the protein content.

2.12. Protein determination

Protein was measured by the Coomassie blue method [73] using bovine serum albumin as the standard.

2.1.3. Statistical analysis

Statistical analysis of tests was carried out by one- or two-way analysis of variance (ANOVA). $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference in all experiments. All data were expressed as the mean \pm S.E.M.

3. Results

3.1. Antioxidant properties of ANT in vitro

Fig. 1 shows the different experiments performed with the pons homogenate to test the antioxidant capacity of ANT in a range between 1 and 100 $\mu\text{g/ml}$. First, Fig. 1A shows a general representation of the chemical structure of ANT. Next, the capacity of ANT on the DPPH reduction and the effective concentration to reduce 50% of

DPPH (EC_{50}) were investigated. The DPPH test is widely used in studies of reactions that involve free radicals where its main function is to act as a colorimetric reagent to verify antioxidant compounds. In this experiment, it was shown that the ANT had an EC_{50} of 24 $\mu\text{g/ml}$, which was a lower antioxidant capacity compared with the standard quercetin that showed an EC_{50} of 3 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 1B). Thus, the reduction of DPPH indicates that ANT can act as scavengers of reactive species. Our next step was to test their antioxidant abilities on the content of MDA, protein carbonyl and NO_x levels in the pons homogenate subjected to oxidative stress by H_2O_2 or nitrosative stress by SNP. As seen in Fig. 1C and D, the 30- and 100- $\mu\text{g/ml}$ concentrations of ANT were able to protect the pons homogenate from the lipid peroxidation induced by SNP ($F_{7, 24} = 18.36$, $P < 0.0001$, Fig. 1C) and H_2O_2 [$F_{7, 24} = 63.49$, $P < 0.0001$, Fig. 1D]. The damage to the

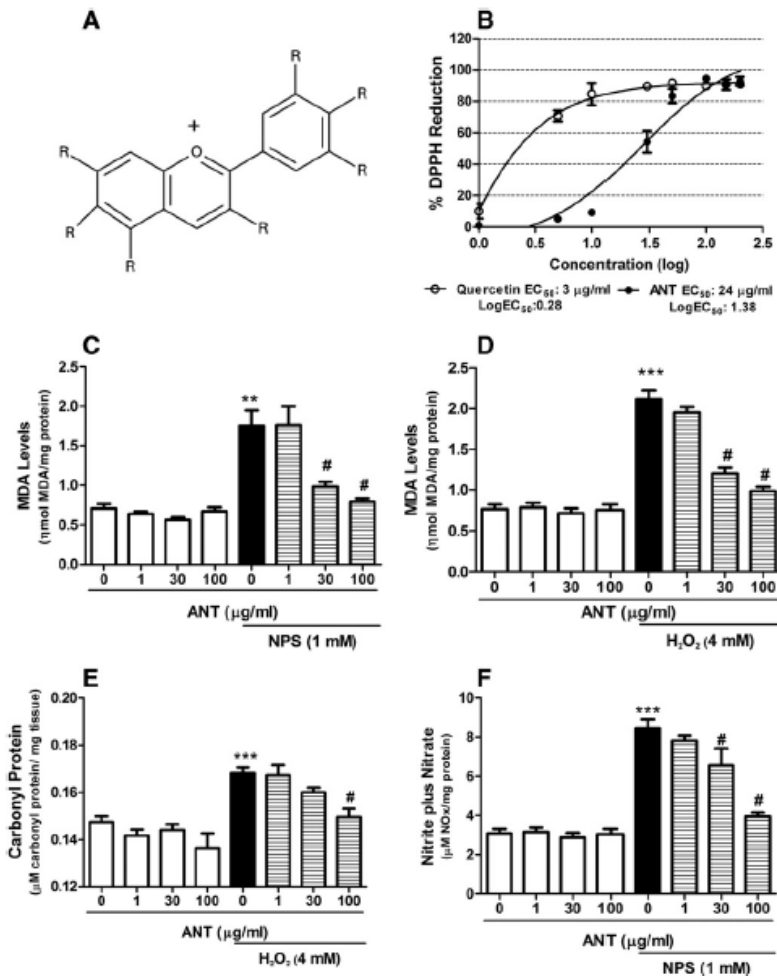


Fig. 1. Antioxidant effects of ANT in vitro. (A) General chemical structure of ANT. (B) Properties of ANT (●) and quercetin (positive control, ○) on the DPPH reduction ($n=4$). Antioxidant effects of ANT (1–100 $\mu\text{g/ml}$) on the content of MDA (C and D), carbonyl protein (E) and nitrites and nitrates (F) in the pons of rats subjected to insults by nitrosative and oxidative stress induced by nitroprusside sodium (NPS 1 mM) or hydrogen peroxide (H_2O_2 4 mM). *Denotes a significant difference from the vehicle group. #Denotes a significant difference from the NPS or H_2O_2 group. Statistical analysis obtained by one-way ANOVA (post hoc Student Newman-Keuls test, $n=4$).

content protein was induced by H_2O_2 , and the NOx production was induced by SNP. Fig. 1C shows that only 100 $\mu\text{g/ml}$ was able to protect the protein content of the oxidative damage caused by H_2O_2 ($F_{7,24}=12.84$, $P<0.001$, Fig. 1D), whereas in Fig. 1E, both the 30- and 100- $\mu\text{g/ml}$ concentrations of ANT were able to protect the increase in NOx induced by NPS ($F_{7,24}=34.43$, $P<0.001$, Fig. 1D). SNP and H_2O_2 are widely used to test the antioxidant capacity of compounds *in vitro*.

3.2. ANT restore the redox state and reduce oxidative damage induced by demyelination in the pons of rats

Fig. 2 shows the HNE-His, MDA, protein carbonyl, NOx, NPSH and GSH levels and the SOD activity in the pons of rats demyelinated with EB and treated with ANT 30 and 100 mg/kg. It can be seen that the demyelination induced by EB increased HNE-His ($F_{5,38}=24.120$, $P<0.01$, Fig. 2A), MDA ($F_{5,38}=12.65$, $P<0.01$, Fig. 2B), carbonyl protein ($F_{5,38}=48.690$, $P<0.01$, Fig. 2C) and NOx levels ($F_{5,38}=9.339$, $P<0.01$, Fig. 2D) in the pons. In addition, treatments with ANT 30 and 100 mg/kg did not alter the levels of these parameters *per se* and were able to prevent the increase in HNE-His ($F_{2,33}=15.270$, $P<0.01$, Fig. 2A), MDA ($F_{2,33}=4.018$, $P<0.05$, Fig. 2B), protein carbonyl ($F_{2,33}=39.390$, $P<0.01$, Fig. 2C) and NOx levels ($F_{2,33}=14.26$, $P<0.01$, Fig. 2D) induced by experimental demyelination. Additionally, it was also observed that

experimental demyelination reduced the content of NPSH ($F_{5,38}=11.31$, $P<0.001$, Fig. 2E) and GSH ($F_{5,38}=8.277$, $P<0.001$, Fig. 2F), and only the dose of 100 mg/kg was able to prevent these reductions in NPSH ($F_{1,22}=5.425$, $P<0.05$, Fig. 2E) and GSH levels ($F_{1,22}=10.89$, $P<0.05$, Fig. 2F) induced by EB. The experimental demyelination also reduced SOD activity ($F_{5,38}=5.453$, $P<0.05$, Fig. 2G), and both doses of ANT were able to prevent the reduction in the activity of this enzyme in the EB group ($F_{2,32}=3.570$, $P<0.05$, Fig. 2G).

3.3. ANT prevent the impairment of Na^+K^+ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase activities in animals experimentally demyelinated and the correlation between ionic pump activity and oxidative stress markers in the EB group

In Fig. 3, we investigated whether demyelination impairs the activity of the key enzymes involved in regulating synaptic transmission and ionic gradients in neurons. Thus, the total ATPase (A), Na^+K^+ -ATPase (B) and Ca^{2+} -ATPase (C) activities in the pons of rats experimentally demyelinated with EB and treated with ANT were investigated. The enzymatic assay for the total ATPase showed that ANT 30 and 100 mg/kg did not alter the ATPase activities. It was also observed that the experimental demyelination reduced the total ATPase activity by approximately 28% ($F_{5,38}=3.210$, $P<0.05$, Fig. 3B),

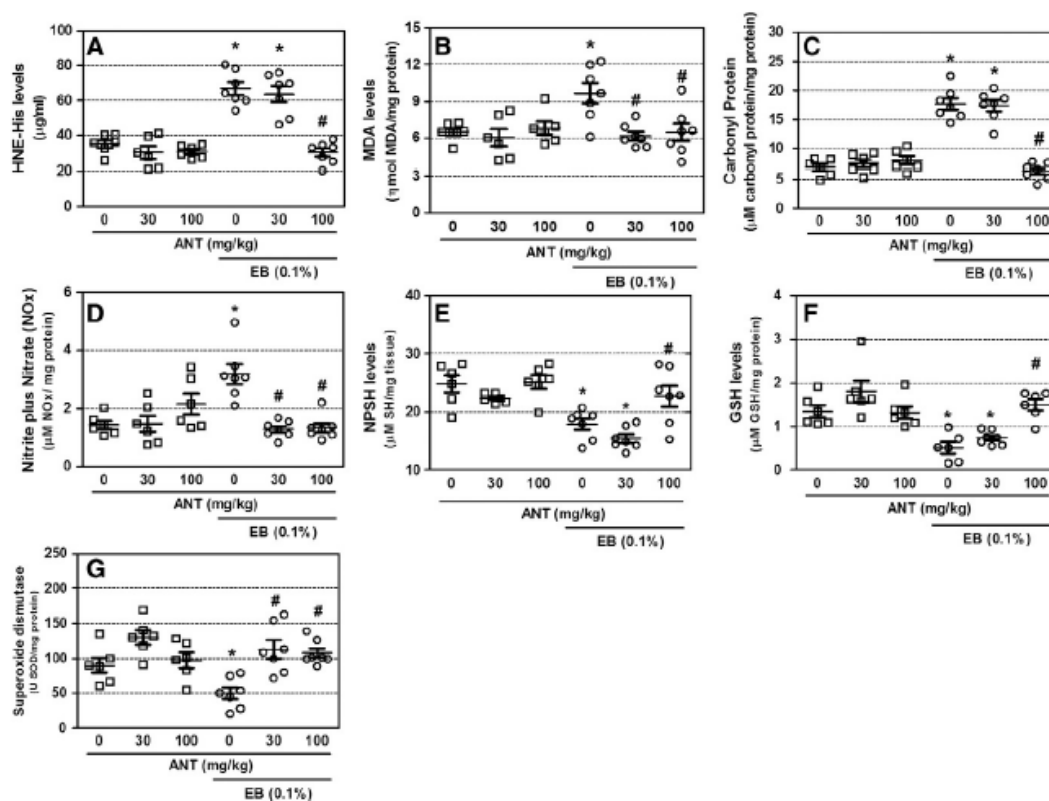


Fig. 2. Protective effects of ANT on the impairment of the redox state induced by EB in the pons of rats. (A) HNE-His, (B) MDA content, (C) protein carbonyl content, (D) nitrite and nitrate content, (E) NPSH levels, (F) GSH levels and (G) SOD activity. *Denotes a significant difference from the vehicle group. #Denotes a significant difference compared with the EB group (one- or two-way ANOVA followed by *post hoc* SNK, $n=6-7$).

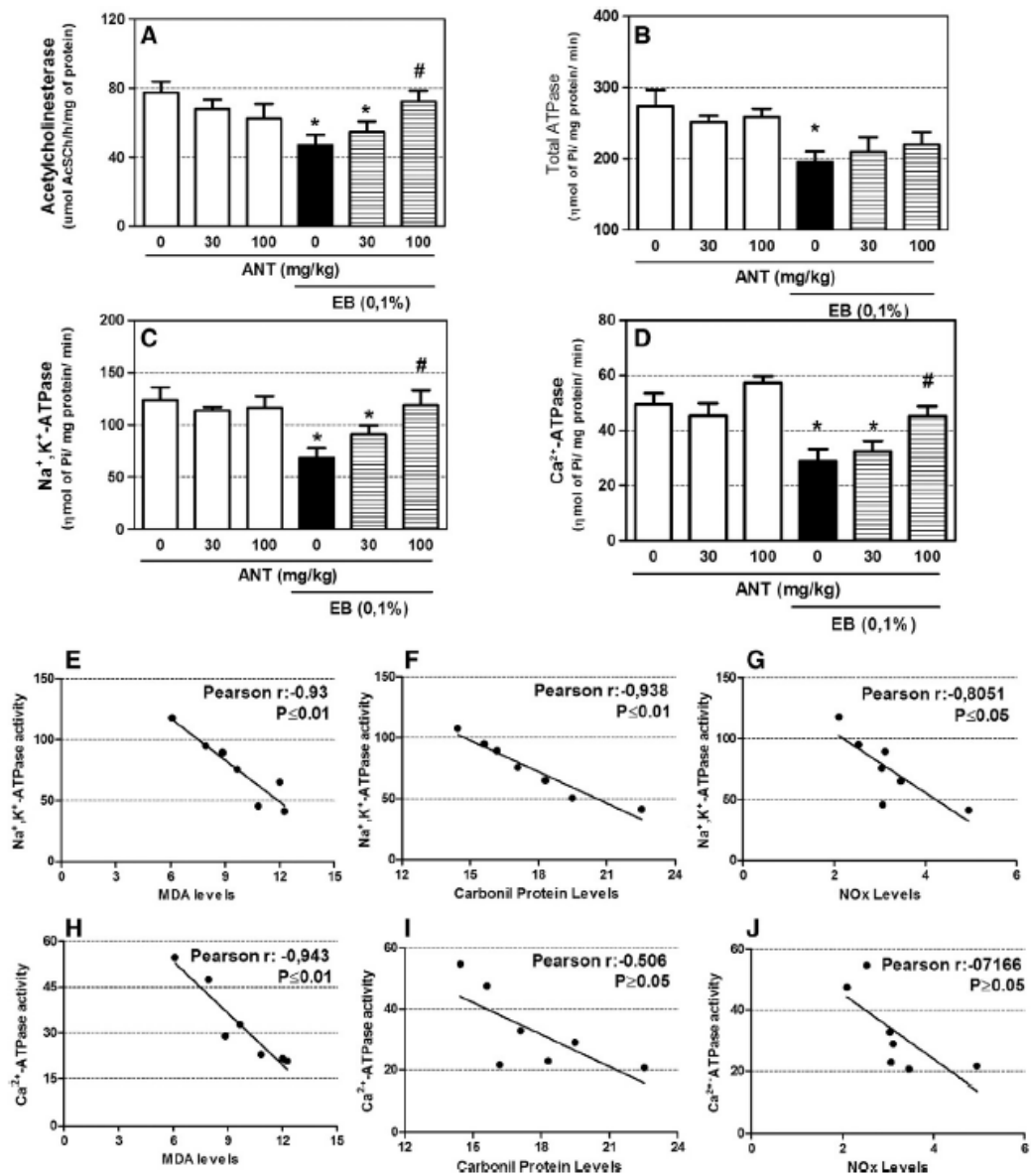


Fig. 3. Involvement of oxidative stress induced by EB in the reduced activity of membrane ATPases: the protective effect of ANT. Total ATPase (A), Na⁺, K⁺-ATPase (B) and Ca²⁺-ATPase activities (C) in the pons of rats subjected to experimental demyelination with EB and treated orally with ANT for 7 days. *Denotes a significant difference from the vehicle group. #Denotes a significant difference compared with the EB group (one- or two-way ANOVA followed by *post hoc* SNK, *n*=7). Correlation between the activity of the enzyme Na⁺, K⁺-ATPase with the levels of MDA (D), protein carbonyl (E) and nitrite and nitrate (F), and the activity of the enzyme Ca²⁺-ATPase with the levels of MDA (G), protein carbonyl (H) and nitrites and nitrates (I) in the rats experimentally demyelinated (Pearson correlation coefficient, *n*=7).

and treatment with ANT did not prevent the reduction in the overall ATPase. The experimental demyelination decreased the Na⁺, K⁺-ATPase (44%) ($F_{3,38}=5.285$, $P<.01$, Fig. 3C) and Ca²⁺-ATPase (40%) ($F_{3,38}=7.032$, $P<.01$, Fig. 3D) activities. Treatment with ANT at a dose of 100 mg/kg

prevented the reduction of the Na⁺, K⁺-ATPase ($F_{1,22}=3.677$, $P<.01$, Fig. 3C) and Ca²⁺-ATPase ($F_{1,22}=4.035$, $P<.05$, Fig. 3D) activities.

Since we found a reduction in the activity of the Na⁺, K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase enzymes and increased levels of oxidative stress

markers, the next step was to investigate a possible correlation between the ion pump activities with MDA, protein carbonyl and NOx levels in the pons of rats experimentally demyelinated (Fig. 5). Fig. 3E, F and G shows a negative correlation between Na^+, K^+ -ATPase activity with MDA (Pearson r : -0.93 , $P < .01$), protein carbonyl (Pearson r : -0.938 , $P < .01$) and NOx levels (Pearson r : -0.805 , $P < .05$). However, the activity of the Ca^{2+} -ATPase enzyme demonstrated a negative correlation only with the MDA level (Pearson r : -0.943 , $P < .01$; Fig. 3H). No significant difference was observed for the correlations between Ca^{2+} -ATPase and protein carbonyl (Fig. 3I) and NOx (Fig. 3J) levels. These findings show a correlation between the decreases in the activity of these enzymes and the increase in markers of oxidative damage.

3.4. ANT restore interleukin levels and TNF- α and INF- γ induced by experimental demyelination in the pons of rats and reduce the inflammatory cell infiltration markers

Fig. 4 shows the levels of inflammatory markers in the animals experimentally demyelinated with EB and treated with ANT. The experimental demyelination increased the IL-1 β content, and the 30- and 100-mg/kg treatments were able to reduce the increase of IL-1 β ($F_{2,32} = 80.95$, $P < .001$, Fig. 4A). The same effect was observed for IL-6

levels ($F_{2,32} = 70.84$, $P < .001$, Fig. 4B). Fig. 4C shows that the experimental demyelination reduced the IL-10 content, an important anti-inflammatory molecule. Treatment with ANT at both doses prevented the reduction in the IL-10 level in the EB group ($F_{2,32} = 8.88$, $P < .001$, Fig. 4C). In addition, ANT 100 mg/kg reduced IL-1 β , and ANT 30 and 100 mg/kg promoted an increase in IL-10. It can be seen that the experimental demyelination promoted an increase in the INF- γ and TNF- α levels. The ANT doses of 30 and 100 mg/kg were able to prevent the increase of INF- γ ($F_{2,32} = 4.92$, $P < .05$, Fig. 4D) and TNF- α ($F_{2,32} = 165.70$, $P < .05$, Fig. 4E) in the pons of rats experimentally demyelinated. Furthermore, ANT 100 mg/kg reduced the levels of INF- γ and TNF- α .

Moreover, the demyelination induced by EB increased the MPO activity, and ANT doses of 30 and 100 mg/kg were able to prevent this effect ($F_{2,28} = 3.582$, $P < .05$, Fig. 4G). No significant difference was observed in the activity of NAGase in the pons of rats ($F_{2,28} = 0.620$, $P < .05$, Fig. 4F).

3.5. ANT prevent morphological alterations in neurons and infiltrated inflammatory cells in EB-induced demyelination

The histological analysis of the pons caudal sections of the rats treated 7 days after the injection of EB revealed that ANT (100 mg/kg)

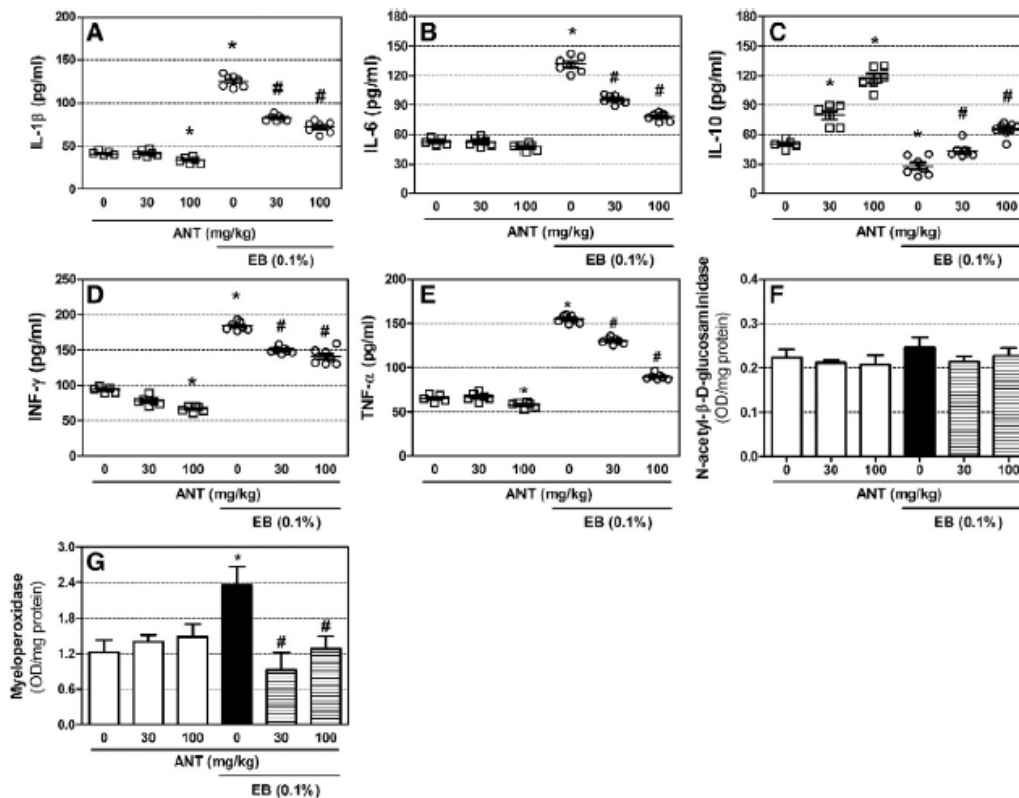


Fig. 4. Anthocyanins reduce the production of proinflammatory cytokines and prevent the increase of myeloperoxidase activity in the pons of rats experimentally demyelinated with EB. (A) IL-1 β content, (B) IL-6 content, (C) IL-10 content, (D) INF- γ , (E) TNF- α , (F) NAGase activity and (G) myeloperoxidase activity. *Denotes a significant difference from the vehicle group. #Denotes a significant difference compared with the EB group (one- or two-way ANOVA followed by *post hoc* SNK, $n = 7$).

were also able to prevent the increase of infiltrated inflammatory cells upon EB injection by H&E staining (Fig. 5A). In contrast, a complete decrease in the number of infiltrated inflammatory cells in the EB-injected rats that were treated daily with ANT30 compared with EB plus ANT100 was not observed (Fig. 5A). The EB group showed a marked alteration in the morphology of the neurons but did not show an impaired neuronal viability by cresyl violet staining of Nissl bodies (Fig. 5B). In fact, cresyl violet staining of Nissl bodies in the pons caudal sections was indistinguishable between the control conditions and the EB-injected rats that were treated daily with ANT30 and ANT100 (Fig. 5B).

3.6. Effect of ANT on the loss of myelin induced by EB in the pons of rats

The histological analysis of LFB staining showed the mesencephalon, the pons rostral and the caudal sections of the rats treated with ANT and EB. Fig. 6 shows a marked alteration in the decidual morphology because a status spongiosus was observed due to the loss of the myelin sheath (indicated by arrows, EB group). However, ANT 100 mg/kg appears to show a reduction in the spongiform state and the loss of myelin EB induced (Fig. 6).

3.7. Overview of ANT benefits on the deleterious effects induced by EB injection in an experimental model of MS

Fig. 7 shows a possible mechanism by which the ANT can protect structures rich in myelin against demyelinating diseases. We found a protective effect of ANT on infiltrating inflammatory cells, especially neutrophils. Furthermore, both a reduction in the release of proinflammatory cytokines and markers of oxidative stress were observed. ANT were able to protect the reduction of Na^+, K^+ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase activity. The overall result of this study reflects the real possibility of ANT as a promising candidate for therapeutic use and the necessity of expanding the studies with ANT in humans. In the future, the intention would be to use ANT as nutraceuticals for demyelinating diseases.

3.8. Effect of ANT and EB treatments on the markers of hepatic and renal damage in the serum of rats

The treatment with effective doses of ANT30 or ANT100 did not alter the ALT or AST activities or the urea or creatinine levels compared with the vehicle-treated animals (data not shown).

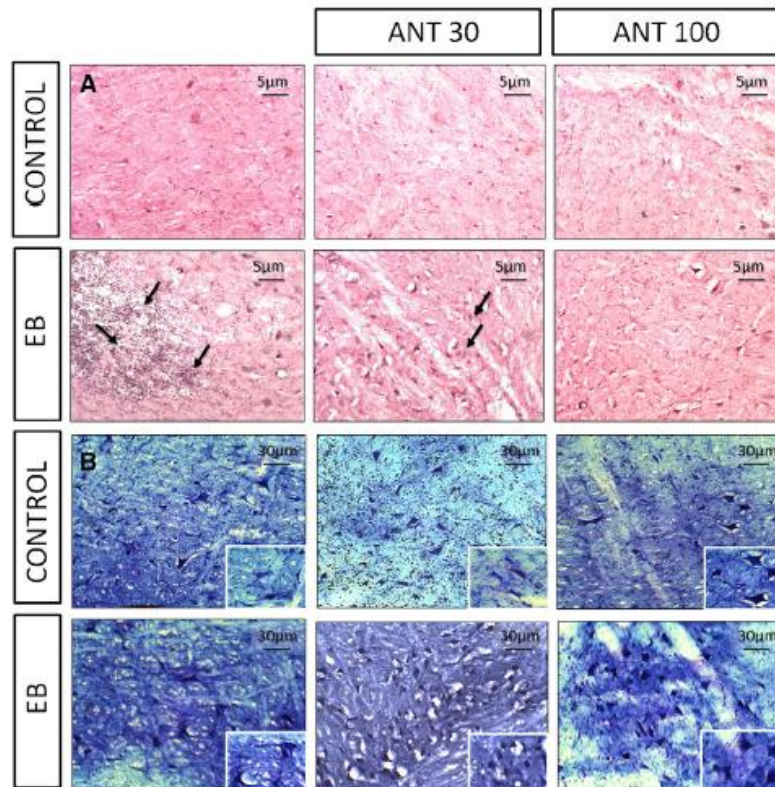


Fig. 5. Analysis of the effects of ANT on the alteration in the morphology of neurons triggered by EB and infiltrated inflammatory cells. The rats were treated (0.1%, 10 μl , into basal cistern) with EB or saline (0.9%, 10 μl). The ANT (30 and 100mg/kg, oral route) were administered daily starting 2 h before surgery and following 6 days of treatment. (A) H&E staining showing images from the pons caudal region at a magnification of the 40 \times . Black arrow demonstrates the infiltrated inflammatory cells near the retrotrapezoid nucleus. (B) Cresyl violet staining of Nissl bodies in the pons sections from the control, EB and ANT groups at 10 \times and 40 \times resolution.

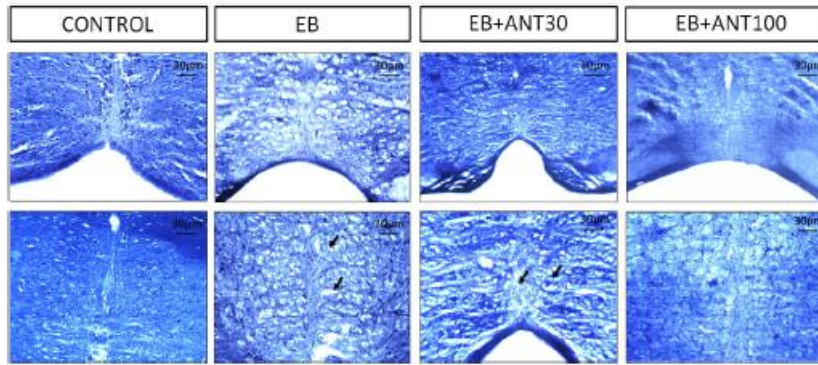


Fig. 6. Representative LFB staining sections from the pons region in the EB and ANT groups. The rats were treated with EB (0.1%, 10 μ l into basal cistern) or saline. The ANT (30 and 100 mg/kg, oral route) were administered daily starting 2 h before surgery and following 6 days of treatment. Images from the first rectangular box at a magnification of the 4 \times , and the second rectangular box demonstrated further magnification at 20 \times . Black arrows demonstrate vacuolated nucleoli from axonal fibers giving a spongiform state due to the loss of the myelin sheath.

4. Discussion

Demyelination is a pathological event in the CNS in that it may be followed by remyelination, a spontaneous regenerative response in which lost myelin internodes are replaced by new ones; this remyelination results in the restoration of saltatory conduction and the demyelination-associated loss of function [74–76]. EB has been used extensively in rats as a demyelinating model to assess endogenous remyelination [77] and oligodendrocyte and astrocyte loss, which are hallmarks of an EB lesion, while the axons remain unaffected [78]. It is important to note that motor deterioration is a major clinical manifestation of MS. In fact, the use of rats submitted to demyelination allows the translation of morphological and behavioral presented in MS and contributes to a better understanding and development of new drugs for this disease. This work was carried out in order to investigate the deleterious effects of toxic demyelination induced by EB on the inflammatory and oxidative stress markers and on the activity of the ion pumps $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$. Furthermore, this study also investigated the protective effect of ANT on the morphological, biochemical and inflammatory changes induced by experimental demyelination in the pons of rats.

A number of investigators have found that flavonoids, including some ANT, possess oral bioavailability in rats [79–81] and that they are able to cross the rat blood–brain barrier [82], which suggests that these compounds can feasibly have a direct effect on the brain. In the literature, many studies demonstrate the bioactivity of ANT towards mammalian cells such as protection against oxidative stress [83], induction of apoptosis and growth inhibition [84] and changes in inflammatory response [85]. Although such studies are not proof of the absorption of ANT into cells, they do demonstrate that ANT have the potential to interact with cells directly. Despite the high water solubility of ANT, it has been demonstrated that when cells are exposed to ANT, they do indeed cross the cell membrane and can be detected in the interior of cells [86].

Despite the fact that there are few studies with diets rich in ANT in humans, some works stand out for the accuracy of the analyses and observed effects such as Thomasset et al. (2009) [87,88], who investigated whether ANT from bilberry cause pharmacodynamic changes consistent with chemopreventive efficacy and generate measurable levels of ANT in blood, urine and target tissue. The extract was administered thrice a day for 7 days at total daily doses of

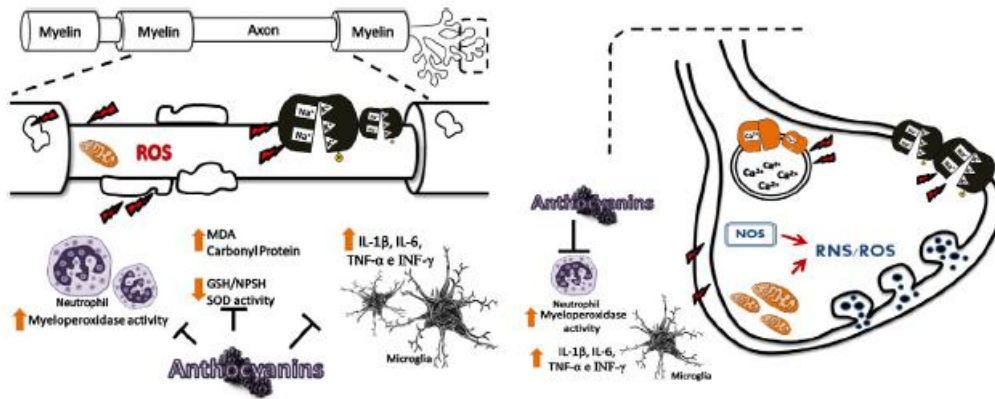


Fig. 7. Overview of ANT benefits on the deleterious effects induced by EB injection in an experimental model of MS.

1.4, 2.8 or 5.6 g. These doses span the dietary dose of ANT in *Apc^{Min}* mice (~450 mg/kg mouse = ~2.6 g per 80-kg human extrapolated by dose–surface area comparison), which reduced adenoma number by 30% [89].

ANT dietary consumption in some individuals has been estimated to be up to 200 mg/day, which is higher compared with other flavonoids (23 mg/day) such as quercetin [81,90,91]. Recently, we reported promising results of ANT on the memory deficits and impairment of energy metabolism and purinergic signaling caused by intraperitoneal administration of scopolamine [29]. Furthermore, we also observed that ANT were able to up-regulate the cholinergic pathway and restore the activity of ionic pumps induced by scopolamine [92] and intracerebroventricular streptozocin administration, which is a model of sporadic dementia for Alzheimer's disease [93]. However, research focused on the experimental models of MS have not yet been investigated.

First, we verified through experiments the *in vitro* antioxidant properties of ANT. It was observed that ANT were able to prevent an increase in MDA, protein carbonyl and NOx levels induced by H₂O₂ and SNP. ANT 30 and 100 µg/ml showed an antioxidant capacity to different markers of oxidative/nitrosative damage. In addition, we also investigated the ability of ANT on the DPPH reduction, and its effective concentration was determined to reduce 50% of DPPH compared with the standard quercetin (purity >99%; Fig. 2); it was also shown that the ANT had an EC₅₀ of 24 µg/ml (Fig. 1).

In the brain, the high content of polyunsaturated fatty acids and the high utilization of oxygen account for the susceptibility to free radical damage. Oxidative stress is likely to have an important role in aging and in the development of a number of neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and MS [94–96]. Because ANT have the ability to act as scavengers of reactive species *in vitro*, two doses (30 or 100 mg/kg) were chosen to investigate the neuroprotective effects in animals exposed to EB. First, we demonstrated that EB promoted an increase in the markers of oxidative damage, such as HNE-His, MDA, NOx and protein carbonyl content, and a decrease in GSH and NPSH levels (Fig. 2). These findings are consistent with previous studies that showed an increase in the markers of oxidative damage [36,97,98] after EB administration. In addition to these findings, a decrease in SOD activity can be observed. The protective effect of ANT was also investigated, and the dose of 100 mg/kg showed a better protective effect compared with 30 mg/kg on oxidative stress. Moreover, the preliminary results lacked a solid biological basis due to the fact that oxidative stress leads to demyelination or the demyelination process leads to a worsening of the redox state in the pons of rats experimentally demyelinated. Oral administration of ANT was able to prevent the damage in the lipid and protein content and reduce the consumption of GSH and NPSH levels. In addition, ANT restored the activity of SOD, but they did not show an effect, *per se*, on SOD activity; however, this denotes that ANT can operate by preventing the exhaustive enzymatic activity of SOD in pathologic situations and/or due to the inactivation caused by the excess of free radicals [99,100].

Studies have shown that the reactive species are responsible for the disturbances in the ion pump activities, namely, Na⁺,K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase [101,102]. Our results show that the EB reduced the total ATPase activity, Na⁺,K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase (Fig. 3). We also observed that the 100-mg/kg dose was able to prevent the decline in the activity of these enzymes. Evidence in the literature has demonstrated a decrease in both the activity and the expression of Na⁺,K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase in the development of neurodegenerative diseases, as well as in MS, due to axonal degeneration and a reduction in the synaptic terminals [15–17]. Moreover, the marked reduction of these ions pumps can occur due to the oxidation of the SH groups present in its structure, as well as the oxidation of the lipid membranes that lead to a destabilization of the optimal conformation

and ion transport [102,56,103–106]. Additionally, we found a correlation between the decreases in Na⁺,K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase activity and the increase in markers of oxidative stress (Fig. 3). It is important to note that demyelination is a complex process, and we cannot rule out that the signaling pathways regulating the Na⁺,K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase activities through the protein kinases or the phosphorylation of amino acid residues are one of the mechanisms that modulate the catalytic activity of Na⁺,K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase [58,107]. For this reason, enzymatic changes correlated with oxidative stress parameters not necessarily exclude other molecular events involved in this effect.

After each depolarization, Na⁺,K⁺-ATPase rapidly promotes three Na⁺ ions to the extracellular medium and two K⁺ ions into the axoplasm in an energy-dependent manner [10]. Rapid repolarization permits the rapid and repetitive axonal firing, which is a necessary event for proper neuronal function [108,109]. When the axons are demyelinated, the Na⁺ channels diffuse away from the nodes [110]. This Na⁺ channel redistribution increases the Na⁺ influx during impulse conductance, and a higher activity of the Na⁺,K⁺-ATPase is necessary to restore the concentration gradients. Thus, a decline in the activity of this enzyme directly compromises axonal impulse transmission [15].

Previous studies have described that demyelination with EB led to neuroinflammation with a peak at day 3 postinjection [41]. However, we conducted studies to verify if the production of reactive species and oxidative damage originated from a failure in neurotransmission due to the absence of myelin in the course axons or if there was a local neuroinflammatory process. Our results showed that, even at the seventh day post EB injection, there was an increase in the inflammatory cytokines, such as IL-1β, IL-6, TNF-α and INF-γ, as well as a reduction in IL-10. In contrast, when the EB animals received ANT (30 or 100 mg/kg), a decrease in all cytokines tested was observed. Thus, our findings also revealed an effect of ANT 100 mg/kg in reducing the proinflammatory interleukins, whereas 30 or 100 mg/kg increased the content of IL-10. However, it should be kept in mind that the treatment with ANT reduced the NOx levels in the EB groups (Fig. 2C), and this appears to agree with the studies that showed berry ANT suppressed the expression iNOS, TNF-α, IL6 and IL-1β in the liver [111,112] and the secretion of proinflammatory mediators by the macrophage inhibition of NF-kappaB [113].

It is important to note that EB injection can induce an activation of microglia, which has the ability to phagocytize and act in defense of the CNS by recognizing antigens and protecting against potential pathogens [34,43]. It is plausible that most cytokines are produced from microglia, but we cannot fail to highlight the role of blood cell migration to the brain, such as that observed in H&E staining (Fig. 5A). Because there was limited understanding of the mechanism of invasion of blood cells in the pons of EB animals, we used a second experimental approach to confirm the types of cells present in the lesion sites, now based on the NAGase and MPO activities, which are markers for macrophages and neutrophils, respectively [70–72]. We found that EB increased the MPO activity. These results denote that the inflammatory infiltrate is characterized by the presence of neutrophils, which are present at the peak of demyelination, and that these cells can contribute to the production of inflammatory interleukins. This finding is in accordance with Chen et al. (2008) who showed that MPO expression corresponded with the areas of inflammatory cell infiltration and demyelination, and higher MPO activity was detected by a prototype paramagnetic MPO sensor, which suggests that MPO activity is a marker for MS [114–116]. The hypochlorous acid is a product of MPO activity. The presence of neutrophils and the release of reactive species can contribute to the increased local oxidative stress, damage to biological molecules; ions pump activities reduction, which can lead to the death of oligodendrocytes. In this way, the generation of reactive species from neutrophils could also be associated with a central role in causing demyelination.

The cytokine production and other mediators, such as TNF- α , INF-C and reactive species, can activate initiator caspases [117], which are involved in the development of apoptosis. Apoptosis contributes to oligodendrocyte depletion in MS lesions and ultimately increases demyelination [118–120]. One concern in this study is whether BE compromised neuronal viability because axonal degeneration occurred. Using histochemical experiments with cresyl violet staining of Nissl Bodies (Fig. 5B) in the mesencephalon, we verified that the pons rostral and caudal sections did not have a significant reduction in the number of neurons, but a morphological alteration was observed in the EB groups. Therefore, EB induced axonal demyelination as observed in LFB staining (Fig. 6) without compromising the neuronal viability in these regions. In addition, ANT 100 mg/kg appear to show a reduction in the spongiform state and the loss of myelin EB induced (Fig. 6). Consistent with our results, Stettner (2013) recently reported that wine compounds, including ANT, promote myelination in an *in vitro* mouse model of the peripheral nerve system [33].

In the present work, it was found that the ANT treatment partially inhibited the inflammation exacerbation induced by the interleukins in the pons, attenuated the generation of the ROS and reduced the ion pump activities induced by EB. In addition, and perhaps more importantly, the inhibition of MPO together with the reduced infiltrated inflammatory cells observed in the rats that were treated daily with ANT completely prevented the noxious effects of EB on demyelination, and this effect may denote a direct action of ANT in modulating the local inflammatory response of the demyelinated lesions (Fig. 7). Finally, we suggest that ANT could be promising candidates for the new engineering of drugs adjuvant to the conventional treatment for MS, as well as a possible flavonol target for clinical trials.

Conflicts of interest statement

There are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This study was supported by the Christian Hansen LTDA and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/no. 115566/2013-9). We thank Dr. Jessié Gutierrez and Dr. Marta Amaral for the assistance and preparation of histochemical experiments.

References

- [1] Stadelmann C, Wegner C, Brück W. Inflammation, demyelination, and degeneration – recent insights from MS pathology. *Biochim Biophys Acta* 1812;2011: 275–82.
- [2] Kipp M, van der Valk P, Amor S. Pathology of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2012;11:506–17.
- [3] Maillart E, Papeix C. Treatment of multiple sclerosis: new approaches to treat case by case. *Rev Prat* 2013;63:647–50.
- [4] Stys PK. Pathoetiology of multiple sclerosis: are we barking up the wrong tree? *FT000 prime reports*. 2013;5:20.
- [5] Mehanna R, Jankovic J. Movement disorders in multiple sclerosis and other demyelinating diseases. *J Neurol Sci* 2013;328:1–8.
- [6] Irvine KA, Blakemore WF. Remyelination protects axons from demyelination-associated axon degeneration. *Brain* 2008;131:1464–77.
- [7] Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, et al. Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 1998;280:1610–3.
- [8] Skou JC. Enzymatic basis for active transport of Na⁺ and K⁺ across cell membrane. *Physiol Rev* 1965;45:596–617.
- [9] Skou JC. The (Na⁺ + K⁺)-ATPase: coupling of the reaction with ATP to the reaction with Na⁺ and K⁺. *Ann N Y Acad Sci* 1982;402:169–84.
- [10] Kaplan JH. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem* 2002;71:511–35.
- [11] Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlsh SJ. Structure and mechanism of Na, K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu Rev Physiol* 2003;65: 817–49.
- [12] Aperia A. New roles for an old enzyme: Na, K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med* 2007;261:44–52.
- [13] Fakira AK, Elkabes S. Role of plasma membrane calcium ATPase 2 in spinal cord pathology. *World J Biol Chem* 2010;1:103–8.
- [14] Tachibana T, Ogura H, Tokunaga A, Dai Y, Yamanaka H, Seino D, et al. Plasma membrane calcium ATPase expression in the rat spinal cord. *Brain Res Mol Brain Res* 2004;131:26–32.
- [15] Young EA, Fowler CD, Kidd G, Chang A, Rudick R, Fisher E, et al. Imaging correlates of decreased axonal Na⁺/K⁺ ATPase in chronic multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 2008;63:428–35.
- [16] Garay L, Gonzalez Denisse MC, Gierman L, Meyer M, Lima A, Roig P, et al. Steroid protection in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation* 2008;15:76–83.
- [17] Kumellas MP, Nicot A, Shull GE, Elkabes S. Plasma membrane calcium ATPase deficiency causes neuronal pathology in the spinal cord: a potential mechanism for neurodegeneration in multiple sclerosis and spinal cord injury. *FASEB J* 2005; 19:298–300.
- [18] Essa MM, Vijayan RK, Castellano-Gonzalez G, Memon MA, Braidly N, Guillemin GJ. Neuroprotective effect of natural products against Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 2012;37:1829–42.
- [19] Otaegui-Arrozola A, Amiano P, Elbusto A, Urdaneta E, Martinez-Lage P. Diet, cognition, and Alzheimer's disease: food for thought. *Eur J Nutr* 2014;53(1): 1–23. <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-013-0561-3>.
- [20] Pratico D. Antioxidants for Alzheimer disease. *JAMA Neurol* 2013;70(2):270.
- [21] Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* 2013;698:6–18.
- [22] Tasset I, Agüera E, Sanchez-Lopez F, Feijoo M, Giraldo AL, Cruz AH, et al. Peripheral oxidative stress in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Biochem* 2012;45:440–4.
- [23] Acar A, Ugur Cevik M, Eviyaoglu O, Uzar E, Tamam Y, Arkanoglu A, et al. Evaluation of serum oxidant/antioxidant balance in multiple sclerosis. *Acta Neurol Belg* 2012;112:275–80.
- [24] Welch CR, Wu Q, Simon JE. Recent advances in anthocyanin analysis and characterization. *Curr Anal Chem* 2008;4:75–101.
- [25] Williams CA, Grayer RJ. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep* 2004; 21:539–73.
- [26] Williamson G, Clifford MN. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *Br J Nutr* 2010;104(Suppl 3):S48–66.
- [27] Kahkonen MP, Hopia AL, Heinonen M. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2001;49:4076–82.
- [28] Kahkonen MP, Heinonen M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J Agric Food Chem* 2003;51:628–33.
- [29] Gutierrez JM, Carvalho FB, Schetinger MR, Rodrigues MV, Schmatz R, Pimentel VC, et al. Protective effects of anthocyanins on the ecdonucleotidase activity in the impairment of memory induced by scopolamine in adult rats. *Life Sci* 2012; 91:1221–8.
- [30] Mossalayi MD, Rambert J, Renouf E, Micolleau M, Merillon JM. Grape polyphenols and propolis mixture inhibits inflammatory mediator release from human leukocytes and reduces clinical scores in experimental arthritis. *Phytomedicine* 2013;21(3):290–7.
- [31] Serra D, Paixao J, Nunes C, Dinis TC, Almeida LM. Cyanidin-3-glucoside suppresses cytokine-induced inflammatory response in human intestinal cells: comparison with 5-aminosalicylic Acid. *PLoS One* 2013;6(8):e73001.
- [32] Riso P, Klimis-Zacas D, Del Bo C, Martini D, Campolo J, Vendrame S, et al. Effect of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink intervention on markers of oxidative stress, inflammation and endothelial function in humans with cardiovascular risk factors. *Eur J Nutr* 2013;52:949–61.
- [33] Stettner M, Wolfram K, Mausberg AK, Albrecht P, Derksen A, Methner A, et al. Promoting myelination in an *in vitro* mouse model of the peripheral nerve system: the effect of wine ingredients. *PLoS One* 2013;7(8):e66079.
- [34] Mazzanti CM, Spanevello R, Ahmed M, Pereira LB, Goncalves JF, Correa M, et al. Pre-treatment with ebselen and vitamin E modulate acetylcholinesterase activity: interaction with demyelinating agents. *Int J Dev Neurosci* 2009;27:73–80.
- [35] Mazzanti CM, Spanevello RM, Morsch A, Zanin R, Battisti V, Ahmed M, et al. Previous treatment with ebselen and vitamin E alters adenine nucleotide hydrolysis in platelets from adult rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. *Life Sci* 2007;81:241–8.
- [36] Spanevello R, Mazzanti CM, Schmatz R, Bagatini M, Stefanello N, Correa M, et al. Effect of vitamin E on ecdonucleotidase activities in synaptosomes and platelets and parameters of oxidative stress in rats experimentally demyelinated. *Brain Res Bull* 2009;80:45–51.
- [37] Beckmann DV, Carvalho FB, Mazzanti CM, Dos Santos RP, Andrade AO, Aiello G, et al. Neuroprotective role of quercetin in locomotor activities and cholinergic neurotransmission in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. *Life Sci* 2014;103(2):79–87.
- [38] Choi HS, Song HS, Ukeda H, Sawamura M. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J Agric Food Chem* 2000;48:4156–61.
- [39] Bondan EF, Lallo MA, Dagli ML, Pereira LA, Graca DL. Blood-brain barrier breakdown following gliotoxic drug injection in the brainstem of Wistar rats. *Arq Neuropsiquiatr* 2002;60:582–9.
- [40] Bondan EF, Lallo MA, Orsini H, Bentubo HL, Yazbek A, Macrini DJ, et al. Evaluation of locomotor activity after a local induction of toxic demyelination in the brainstem of Wistar rats. *Arq Neuropsiquiatr* 2006;64:496–503.
- [41] Bondan EF, Lallo MA, Sinhorini IL, Pereira LA, Graca DL. The effect of cyclophosphamide on brainstem remyelination following local ethidium bromide injection in Wistar rats. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2000;32:603–12.

- [42] Rendell PG, Henry JD, Phillips LH, de la Piedad Garcia X, Booth P, Phillips P, et al. Prospective memory, emotional valence, and multiple sclerosis. *J Clin Exp Neuropsychol* 2012;34(7):738–49.
- [43] Mazzanti CM, Spanevello RM, Pereira LB, Gonçalves JF, Kaizer R, Correa M, et al. Acetylcholinesterase activity in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon beta. *Neurochem Res* 2006;31:1027–34.
- [44] Bondan EF, Lallo MA, Martins Mde F, Graca DL. Schwann cell expression of an oligodendrocyte-like remyelinating pattern after ethidium bromide injection in the rat spinal cord. *Arq Neuropsiquiatr* 2010;68:783–7.
- [45] Bondan EF, Lallo MA, Dagli ML, Sanchez M, Graca DL. Investigation into the astrocytic immunoreactivity to GFAP and vimentin in the brainstem of Wistar rats submitted to the ethidium bromide gliotoxic model. *Arq Neuropsiquiatr* 2003;61:642–9.
- [46] Graca DL, Bondan EF, Pereira LA, Fernandes CG, Majorca PC. Behaviour of oligodendrocytes and Schwann cells in an experimental model of toxic demyelination of the central nervous system. *Arq Neuropsiquiatr* 2001;59:358–61.
- [47] Skender-Gazibara M, Cvetkovic-Dozic D, Jovanovic V, Dozic S. Etiopathogenesis of multiple sclerosis. *Arch Oncol* 2001;8–10.
- [48] Minguetti G. Magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: analysis of 270 cases. *Arq Neuropsiquiatr* 2001;59:563–9.
- [49] Saíja A, Prind P, D'Amico N, De Pasquale R, Costa G. Effect of *Vaccinium myrtillus* anthocyanins on triiodothyronine transport into brain in the rat. *Pharmacol Res* 1990;22(Suppl. 3):59–60.
- [50] Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727–47.
- [51] Varadinova MG, Docheva-Drenska DI, Boyadjieva NI. Effects of anthocyanins on learning and memory of ovariectomized rats. *Menopause* 2009;16:345–9.
- [52] Cunha GM, Canas PM, Oliveira CR, Cunha RA. Increased density and synaptoprotective effect of adenosine A2A receptors upon sub-chronic restraint stress. *Neuroscience* 2006;141:1775–81.
- [53] Canas PM, Duarte JM, Rodrigues RJ, Kofalvi A, Cunha RA. Modification upon aging of the density of presynaptic modulation systems in the hippocampus. *Neurobiol Aging* 2009;30:1877–84.
- [54] Duarte JM, Carvalho RA, Cunha RA, Gruetter R. Caffeine consumption attenuates neurochemical modifications in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Neurochem* 2009;111:368–79.
- [55] Klüver H, Barrera E. A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neurocytol* 1953;12:400–3.
- [56] Gutierrez JM, Carvalho FB, Rosa MM, Schmatz R, Rodrigues MV, Vieira JM, et al. Protective effect of α -tocopherol on memory deficits and Na⁺, K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activities in rats with diet-induced hypercholesterolemia. *Biomed Aging Pathol* 2012;2:73–80.
- [57] Wyse AT, Streck EL, Barros SV, Brusque AM, Zugno AL, Wajner M. Methylmalonate administration decreases Na⁺, K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats. *Neuroreport* 2000;11:2331–4.
- [58] Carvalho FB, Mello CF, Marisco PC, Tonello R, Girardi BA, Ferreira J, et al. Spermidine decreases Na⁺, K⁺-ATPase activity through NMDA receptor and protein kinase G activation in the hippocampus of rats. *Eur J Pharmacol* 2012;684:79–86.
- [59] Fiske CH, Subbarow Y. The nature of the "inorganic phosphate" in voluntary muscle. *Science* 1927;65:401–3.
- [60] Rohn TT, Hinds TR, Vincenzi FF. Ion transport ATPases as targets for free radical damage. Protection by an amine oxidase of the Ca²⁺ pump ATPase and Na⁺/K⁺ pump ATPase of human red blood cell membranes. *Biochem Pharmacol* 1993;46:525–34.
- [61] Trevisan G, Maldaner G, Velloso NA, Sant'Anna Gda S, Ilha V, Velho Gewehr Cde C, et al. Antinociceptive effects of 14-membered cyclopeptide alkaloids. *J Nat Prod* 2009;72:608–12.
- [62] Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170–5.
- [63] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351–8.
- [64] Rossato JJ, Zeni G, Mello CF, Rubin MA, Rocha JB. Ebselen blocks the quinolinic acid-induced production of thiobarbituric acid reactive species but does not prevent the behavioral alterations produced by intra-striatal quinolinic acid administration in the rat. *Neurosci Lett* 2002;318:137–40.
- [65] Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001;5:62–71.
- [66] Yan LJ, Traber MG, Packer L. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal Biochem* 1995;228:349–51.
- [67] Schneider Oliveira M, Flavia Furian A, Freire Royes LF, Rechia Figuera M, de Carvalho Myskiw J, Gindri Fiorenza N, et al. Ascorbate modulates pentylentetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience* 2004;128:721–8.
- [68] Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464–78.
- [69] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70–7.
- [70] Lloret S, Moreno JJ. Effects of an anti-inflammatory peptide (antiflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. *Biochem Pharmacol* 1995;50:347–53.
- [71] Suzuki M, Asano Y. Urinary enzyme determination and its clinical significance. C. Enzyme derived from the kidney tubular epithelium — N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. 9. Clinical study of urinary NAG activity in patients with various kidney diseases. *Rinsho Byori* 1983;139–46 [Spec No 56].
- [72] Silva MA, Trevisan G, Klafke JZ, Rossato EF, Walker G, Oliveira SM, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Aloe saponaria* Haw on thermal injury in rats. *J Ethnopharmacol* 2013;146:393–401.
- [73] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [74] Woodruff RH, Franklin RJ. Demyelination and remyelination of the caudal cerebellar peduncle of adult rats following stereotaxic injections of lysolecithin, ethidium bromide, and complement/anti-galactocerebroside: a comparative study. *Glia* 1999;25:216–28.
- [75] Smith KJ, Blakemore WF, McDonald WI. The restoration of conduction by central remyelination. *Brain* 1981;104:383–404.
- [76] Aggarwal S, Yurlow L, Simons M. Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol* 2011;21:585–93.
- [77] Blakemore WF, Franklin RJ. Remyelination in experimental models of toxin-induced demyelination. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;318:193–212.
- [78] Blakemore WF. The case for a central nervous system (CNS) origin for the Schwann cells that remyelinate CNS axons following concurrent loss of oligodendrocytes and astrocytes. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2005;31:1–10.
- [79] Matsumoto H, Inaba H, Kishi M, Tominaga S, Hirayama M, Tsuda T. Orally administered theophyllin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms. *J Agric Food Chem* 2001;49:1546–51.
- [80] Miyazawa T, Nakagawa K, Kudo M, Muraishi K, Someya K. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoiside, into rats and humans. *J Agric Food Chem* 1999;47:1083–91.
- [81] McGhie TK, Ainge GD, Barnett LE, Cooney JM, Jensen DJ. Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. *J Agric Food Chem* 2003;51:4539–48.
- [82] Andres-Lacueva C, Shukitt-Hale B, Galli RL, Jauregui Q, Lamuela-Raventos RM, Joseph JA. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutr Neurosci* 2005;8:111–20.
- [83] Ghosh D, McGhie TK, Zhang J, Adaim A, Skinner M. Effects of anthocyanins and other phenolics of boysenberry and blackcurrant as inhibitors of oxidative stress and damage to cellular DNA in SH-SY5Y and HL-60 cells. *J Sci Food Agric* 2006;86:678–86.
- [84] Zhang Y, Vareed SK, Nair MG. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sci* 2005;76:1465–72.
- [85] Munoz-Espada AC, Watkins BA. Cyanidin attenuates PGE2 production and cyclooxygenase-2 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *J Nutr Biochem* 2006;17:589–96.
- [86] Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000;29:51–60.
- [87] Thomasset S, Berry DP, Cai H, West K, Marczylo TH, Marsden D, et al. Pilot study of oral anthocyanins for colorectal cancer chemoprevention. *Cancer Prev Res* 2009;2:625–33.
- [88] Thomasset S, Teller N, Cai H, Marko D, Berry DP, Steward WP, et al. Do anthocyanins and anthocyanidins, cancer chemopreventive pigments in the diet, merit development as potential drugs? *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;64:201–11.
- [89] Cooke DN, Thomasset S, Boocock DJ, Schwarz M, Winterhalter P, Steward WP, et al. Development of analyses by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography/tandem mass spectrometry of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) anthocyanins in human plasma and urine. *J Agric Food Chem* 2006;54:7009–13.
- [90] Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 2000;130:2073S–85S.
- [91] Frank J, Kama-Eldin A, Lundh T, Maatta K, Torronen R, Vessby B. Effects of dietary anthocyanins on tocopherols and lipids in rats. *J Agric Food Chem* 2002;50:726–30.
- [92] Gutierrez JM, Carvalho FB, Schetinger MR, Agostinho P, Marisco PC, Vieira JM, et al. Neuroprotective effect of anthocyanins on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia in rats. *Int J Dev Neurosci* 2013;33C:88–97.
- [93] Gutierrez JM, Carvalho FB, Schetinger MR, Marisco P, Agostinho P, Rodrigues M, et al. Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. *Life Sci* 2014;96:7–17.
- [94] Vida C, Gonzalez EM, Fuente MD. Increase of oxidation and inflammation in nervous and immune systems with aging and anxiety. *Curr Pharm Des* 2014;20:4656–78.
- [95] Sutherland GT, Chami B, Youssef P, Witting PK. Oxidative stress in Alzheimer's disease: primary villain or physiological by-product? *Redox Rep* 2013;18:134–41.
- [96] Sultana R, Perluigi M, Allan Butterfield D. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radic Biol Med* 2013;62:157–69.
- [97] Abdel-Salam OM, Khadrawy YA, Mohammed NA, Youness ER. The effect of gabapentin on oxidative stress in a model of toxic demyelination in rat brain. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2012;23:61–8.
- [98] Abdel-Salam OM, Khadrawy YA, Salem NA, Sileem AA. Oxidative stress in a model of toxic demyelination in rat brain: the effect of piracetam and vinpocetine. *Neurochem Res* 2011;36:1062–72.

- [99] Maritim AC, Sanders RA, Watkins III JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17:24–38.
- [100] Schmatz R, Perreira LB, Stefanello N, Mazzanti C, Spanevello R, Gutierrez J, et al. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochimie* 2012;94:374–83.
- [101] Streck EL, Zugno AI, Tagliari B, Franzon R, Wannmacher CM, Wajner M, et al. Inhibition of rat brain Na⁺, K⁺-ATPase activity induced by homocysteine is probably mediated by oxidative stress. *Neurochem Res* 2001;26:1195–200.
- [102] Franzon R, Lamers ML, Stefanello FM, Wannmacher CM, Wajner M, Wyse AT. Evidence that oxidative stress is involved in the inhibitory effect of proline on Na⁺, K⁺-ATPase activity in synaptic plasma membrane of rat hippocampus. *Int J Dev Neurosci* 2003;21:303–7.
- [103] Malfatti CR, Burgos LT, Rieger A, Rudge CL, Turmina JA, Pereira RA, et al. Decrease of erythrocyte Na⁺, K⁺-ATPase activity and increased plasma TBARS in prehypertensive patients. *ScientificWorldJournal* 2012;2012:348–246.
- [104] Silva LF, Hoffmann MS, Rambo LM, Ribeiro LR, Lima FD, Furian AF, et al. The involvement of Na⁺, K⁺-ATPase activity and free radical generation in the susceptibility to pentylenetetrazol-induced seizures after experimental traumatic brain injury. *J Neurol Sci* 2011;308:35–40.
- [105] dos Reis EA, de Oliveira LS, Lamers ML, Netto CA, Wyse AT. Arginine administration inhibits hippocampal Na⁺, K⁺-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. *Brain Res* 2002;951:151–7.
- [106] Wyse AT, Bavares CS, Bandinelli C, Streck EL, Franzon R, Dutra-Filho CS, et al. Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME prevents the decrease of Na⁺, K⁺-ATPase activity in midbrain of rats subjected to arginine administration. *Neurochem Res* 2001;26:515–20.
- [107] Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Ferreira J, et al. Prostaglandin E2 modulates Na⁺, K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. *J Neurochem* 2009;109:416–26.
- [108] Bostock H, Sears TA, Sherratt RM. The spatial distribution of excitability and membrane current in normal and demyelinated mammalian nerve fibres. *J Physiol* 1983;341:41–58.
- [109] Bostock H, Sears TA. The internodal axon membrane: electrical excitability and continuous conduction in segmental demyelination. *J Physiol* 1978;280:273–301.
- [110] Waxman SG, Graner MJ, Black JA. Na⁺ channel expression along axons in multiple sclerosis and its models. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:584–91.
- [111] Luo H, Lv XD, Wang GE, Li YF, Kurihara H, He RR. Anti-inflammatory effects of anthocyanins-rich extract from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) on croton oil-induced ear edema and *Propionibacterium acnes* plus LPS-induced liver damage in mice. *Int J Food Sci Nutr* 2014;65:594–601.
- [112] Esposito D, Chen A, Grace MH, Komarnytsky S, Lila MA. Inhibitory effects of wild blueberry anthocyanins and other flavonoids on biomarkers of acute and chronic inflammation in vitro. *J Agric Food Chem* 2014;62(29):7022–8.
- [113] Lee SG, Kim B, Yang Y, Pham TX, Park YK, Manatou J, et al. Berry anthocyanins suppress the expression and secretion of proinflammatory mediators in macrophages by inhibiting nuclear translocation of NF- κ B independent of Nrf2-mediated mechanism. *J Nutr Biochem* 2013;25(4):404–11.
- [114] Chen JW, Breckwoldt MO, Aikawa E, Chiang G, Weissleder R. Myeloperoxidase-targeted imaging of active inflammatory lesions in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 2008;131:1123–33.
- [115] Nagra RM, Becher B, Tourtelotte WW, Antel JP, Gold D, Paladino T, et al. Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1997;78:97–107.
- [116] Forghani R, Wojtkiewicz GR, Zhang Y, Seeburg D, Bautz BR, Pulli B, et al. Demyelinating diseases: myeloperoxidase as an imaging biomarker and therapeutic target. *Radiology* 2012;263:451–60.
- [117] Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 1999;274:20049–52.
- [118] Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis – the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 2006;354:942–55.
- [119] Rus H, Cudrici C, Niculescu F, Shin ML. Complement activation in autoimmune demyelination: dual role in neuroinflammation and neuroprotection. *J Neuroimmunol* 2006;180:9–16.
- [120] Rus H, Cudrici C, Niculescu F. C5b-9 complement complex in autoimmune demyelination: dual role in neuroinflammation and neuroprotection. *Adv Exp Med Biol* 2006;586:139–51.

3.2 Manuscrito 1: Submetido.

Título:

“Anthocyanins control neuroinflammation and consequent memory dysfunction in mice exposed to lipopolysaccharide”

Dados sobre o Periódico:

Brain, Behavior and Immunity

ISSN 0889-1591

Fator de Impacto 6.128

Qualis CAPES A1

Endereço eletrônico <http://www.journals.elsevier.com/brain-behavior-and-immunity/>



Anthocyanins control neuroinflammation and consequent memory dysfunction in mice exposed to lipopolysaccharide

Fabiano B Carvalho^{1#}, Jessié M Gutierrez¹, Andressa Bueno², Adriana M Zago¹, Pâmela Frühauf³, Sara M. Oliveira³, Caroline Rizzi⁴, Roselia M Spanevello⁵, Marta M F Duarte⁶, Thiago Duarte³, Odir A Dellagostin⁴, Cinthia M Andrade^{1,2#}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas; Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS 97105-900, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Pequenos Animais, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, 97105-900, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria/RS, 97105-900, Brasil.

⁴Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Unidade de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Capão do Leão, Pelotas/RS 96010-900, Brasil.

⁵Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Capão do Leão, Pelotas/RS 96010-900, Brasil.

⁶Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria/ RS 97020 001, Brasil.

Corresponding authors.

Cinthia Melazzo de Andrade: Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Setor de Bioquímica e Biologia Molecular do Laboratório de Terapia Celular, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS 97105-900, Brasil. Tel./fax: + 55-55 3220 8460

E-mail address: cmelazzomazzanti@gmail.com

Fabiano Barbosa Carvalho: Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Setor de Bioquímica e Estresse Oxidativo do Laboratório de Terapia Celular, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS 97105-900, Brasil.

Tel./fax: + 55-55 3220 8460

E-mail address: fabiseco@yahoo.com.br

Abstract

We investigated if anthocyanins (ANT) consumption was able to protect the memory loss and to control the CNS inflammatory processes using the neuroinflammation lipopolysaccharide (LPS) model. C57BL6 male mice were treated with ANT (30-100 mg/kg by gavage) with a single dose or during 10 days of pre-treatment until the LPS-administration (250 µg/kg intraperitoneally, post-training in the object recognition task). The ANT protective effect in the memory impairment was observed only for 10 days after a previous treatment (100 mg/kg). ANT prevented the hypothermia episode induced by LPS. ANT prevented the increase in protein carbonyl, NOx and MDA levels in the hippocampus and cerebral cortex (4 and 24 hours). ANT protected changes on the hippocampal neurons morphology (CA1 and CA3 regions, 24 hours) and showed a partial protective effect on the increase in the pro-inflammatory cytokines content, especially Interleukin (IL)-1 β , tumoral necrosis factor - α and on the reduction of IL-10 induced by LPS. ANT 100 mg/kg prevented the infiltration of inflammatory cells in the hippocampal CA3 region at 24 hours post-LPS administration. In parallel, LPS also promoted an increase in myeloperoxidase activity in cerebral cortex and hippocampus. ANT prevented the increase in myeloperoxidase activity and reduced the immunostaining for CD11b in the CA3 region (24 hours). Thus, the pretreatment with ANT can protect memory loss induced by LPS and the release of pro-inflammatory mediators, neutrophil infiltration, oxidative stress and perhaps activated signaling pathways which can lead to microglia-mediated neuroinflammation.

Key-Words: Neuroinflammation, Anthocyanins, Memory, Oxidative stress, Na⁺,K⁺-ATPase, Interleukins.

1. Introduction

Lipopolysaccharide (LPS) is an endotoxin experimentally used as a model to generate inflammatory response both *in vitro* and *in vivo*. LPS impairs antioxidant mechanisms and mitochondrial redox activity, as well as induces a potent activation of inflammatory signaling pathways in astrocytes and microglia through of Toll-like receptor 4 (TLR4) (Jacewicz et al., 2009; Noble et al., 2007). The TLR4 stimulation leads to activation of nuclear factor kappa b (NF- κ B), a factor that regulates gene expression involved in immune responses, including release of the pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-1beta (IL-1 β) (Kielian, 2006; Rivest, 2003). The main deleterious events consequent of neuroinflammation induced by LPS are the release of cytokines, chemokines, production of reactive species, hippocampal cell loss, impairment of learning and memory, and emotional aspects of sickness behavior (Abraham and Johnson, 2009; Fan et al., 2014; Francois et al., 2014; Granger et al., 2013; Henry et al., 2008).

In fact, microglial activation is a faithful sensor of pathologic events in the brain and a decrease in the extent of neuroinflammation is associated with a better prognosis in the progression of neurodegenerative diseases (Allan and Rothwell, 2001, 2003). For example, an increase in IL-1 β can alter the release of neurotransmitters (Mohebiany and Schneider, 2013), modulate neuronal activity (Mandolesi et al., 2013) and synaptic plasticity mechanisms (Di Filippo et al., 2013). Furthermore, the chronic state LPS-induced contributes to progression of neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease (AD) (Jaeger et al., 2009; Miklossy, 2008).

The use of anthocyanins (ANT) as a co-adjuvant to prevention of pathological conditions and neurodegenerative diseases has been widely investigated (Carvalho et al., 2015; Gutierres et al., 2014a; Gutierres et al., 2014b; Gutierres et al., 2012). ANT have antioxidant and anti-inflammatory properties in potential and we recently reported that ANT from *Vitis vinifera* were able to prevent memory deficits induced by scopolamine and in a STZ-Alzheimer's disease model (Gutierres et al., 2014a; Gutierres et al., 2014b; Gutierres et al., 2012). In addition, we also found that ANT suppress the immune cells migration and pro-inflammatory cytokines production in pons of rats in a multiple sclerosis (MS) demyelination model (Carvalho et al., 2015). This natural compound is able to reduce the NF- κ B translocation into the nucleus and the IL-1 β mRNA levels in macrophages exposed to LPS (Lee et al., 2014). Although the ANT

action mechanisms are not well defined, the properties of this phytonutrient had great significance because it found in fruits and vegetables present in the human diet. Moreover, these promising findings reveal potential properties of ANT in inflammatory responses, but studies on LPS-induced neuroinflammation in mice were not investigated yet. Therefore, the present study investigated the neuroprotective effect of ANT consumption on the memory loss, pro-inflammatory mediators' production and oxidative stress markers in the brain of mice exposed to LPS.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* (055:B5), 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), tetrabutylammonium salt malondialdehyde (MDA), 2-thiobarbituric acid (TBA), ouabain octahydrate, adenosine-triphosphate disodium salt hydrate, vanadium (III) chloride, sulfanilamide, N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NEED), acetonitrile, Coomassie Brilliant Blue G, 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine, 4-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminidase and glycine were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Commercial kits for interleukins (IL) -1 β , IL-6, IL-10, tumoral necrosis factor (TNF)- α and interferon (IFN)- γ were purchased from eBioscience (San Diego, USA).

ANT were extracted and purified from *Vaccinium myrtillus L* (AC12-RWSP). This compound is soluble in water and ethanol. AC12-RWSP has 25% total ANT content, among which are malvidin-3- glucoside, peonidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside, delphinidin-3-glucoside, petunidin-3- glucoside, pelargonidin-3-glucoside and peonidin-3-glucoside as determined by high performance liquid chromatography and were commercially available from Christian Hansen A/S (Cod. n° AC12-RWSP). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of highest purity.

2.2 Animals

Male C57BL6 mice (12 weeks old) weighing 30–35 g were used in the study. The animals were maintained in the Central Animal House of the Federal University of Santa Maria in colony cages at an ambient temperature of 23 ± 2 °C and relative humidity of 45–55% with 12 h light/dark cycles. The animals had free access to a standard rodent pellet diet and water *ad libitum*. All procedures were carried out

according to the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care. This work was approved by the ethical committee of the Federal University of Santa Maria (protocol number 23081.005466/2011-13).

2.3 Experimental Protocol

2.3.1 Treatments

Mice were pretreated by gavage with ANT previously dissolved in saline (30 and 100 mg/kg body weight) during 10 days (10 am). On the training day to novel object recognition task, the animals received ANT 2 hours pre-training. This time was chosen due to a prior study showing the high levels of absorption and bioavailability of ANT (McGhie and Walton, 2007; Miyazawa et al., 1999; Morazzoni et al., 1991). ANT were dissolved in saline. The ANT doses were chosen based on protocols developed by our group and previous studies that indicated neuroprotection against experimental models of Alzheimer Disease and MS (Carvalho et al., 2015; Gutierrez et al., 2014a; Gutierrez et al., 2014b; Gutierrez et al., 2012). Control groups received only vehicle (2 ml/kg of saline, daily by gavage). Mice were randomly distributed into six groups: vehicle, ANT 30 mg/kg, ANT 100 mg/kg, LPS, LPS plus ANT 30 mg/kg and LPS plus ANT 100 mg/kg. LPS was administrated intraperitoneally immediately after training. LPS was dissolved in saline and the selected dose was 250 µg/kg as previously describe (Santana Fruhauf et al., 2015).

An animal group was trained in the object recognition task and euthanized 4 hours after training in order to investigate the LPS and ANT effects during a decisive period to memory consolidation. Other group was euthanized 24 hours post training (immediately after test) in order to investigate the LPS and ANT effects in a memory evocation (Kranjac et al., 2013).

The effect of a single dose of ANT (30 or 100 mg/kg) in memory loss induced by LPS was also investigated (1 day). Once a single dose is ineffective for memory protection, the morphological and biochemical analyzes were performed only for the pre-treatment during 10 days with ANT.

2.4 Behavior tasks

2.4.1 Novel Object Recognition Task

The novel object recognition task was performed in a 30 x 30 x 30 cm wooden chamber, with walls painted black and the front wall made of Plexiglas and the floor covered with ethyl vinyl acetate sheet. A light bulb, hanging 60 cm above the behavioral apparatus, provided constant illumination of about 40 lux, and an air-conditioner provided constant background sound isolation. The objects used were pairs of plastic mounting bricks, each pair with different shapes (rectangular, pyramid and stair-like shapes) and colors (white, red and blue), but same size. Throughout the experiments objects were used in a counterbalanced manner and animals did not previously display preference for any of the objects. Chambers and objects were cleaned after each subject was tested with 30 % ethanol. The novel object recognition task was performed as previously described (Marisco et al., 2013).

The task consisted of habituation, training and testing sessions, each of them with the duration of 10 min. In the first session, mice were habituated to the behavioral apparatus and then returned to their home cage. Twenty-four hours later, training session took place, where animals were exposed to two of the same objects (object A), and the exploration time was recorded with two stopwatches. Exploration was recorded when the animal touched or reached the object with the nose at a distance of less than 2 cm. Climbing or sitting on the object was not consider exploration. The test session was carried out 24 h after training. Mice were placed back in the behavioral chamber and one of the familiar objects (i.e. object A) was replaced by a novel object (i.e. object B). The time spent exploring the familiar and the novel objects were recorded. The discrimination index was then calculated, taking into account the difference of time spent exploring the novel (B) and the familiar (A) object $\times 100$ divided by the sum of time spent exploring the novel (B) and the familiar (A), and used as a cognitive parameter $([(T_{\text{novel}} - T_{\text{familiar}})/(T_{\text{novel}} + T_{\text{familiar}})]/100)$. Saline or ANT (30 or 100 mg/kg, by gavage) were administered 2 hours pre-training of the novel object recognition task both acute (1 day) or sub-chronically (during 10 days). Saline or LPS (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, intraperitoneally) were administered immediately post-training.

2.4.2 Open-field

The open-field was performed as previously described (Marisco et al., 2013). Immediately after the novel object recognition task, the animals were transferred to a 30 x 30 x 30-cm open field, with the floor divided into 4 squares. During the 10-min open

field session, the number of crossing and rearing responses was recorded. The open field was used to identify motor disabilities which might influence the novel object recognition task.

2.4.3 Body temperature measurement.

The measured of temperature was realized with a digital thermometer. Baseline temperatures were recorded 30 min before LPS administration and 2, 4 e 24 hours post LPS administration.

2.5 Sample preparation for biochemical parameters

The animals were anesthetized and then euthanized. The brain was removed, and the cerebral cortex and hippocampus were separated. Next, the brain structures were homogenized in a glass potter in a solution of 10 mM Tris-HCl and 0.1 mM EDTA, pH 7.4, on ice. An aliquot of the homogenate was separated. After centrifugation of 1,500 g at 4°C for 15 min, aliquots of the supernatant were stored at -80 °C until the biochemical analyses.

2.6 Enzymatic assays: Determination of Total ATPase and Na⁺,K⁺-ATPase activities

Na⁺,K⁺-ATPase activity was measured in the cerebral cortex and hippocampus supernatant as previously described (Carvalho et al., 2012). Briefly, the assay medium consisted of (in mM) 30 Tris-HCl buffer (pH 7.4), 0.1 EDTA, 50 NaCl, 5 KCl, 6 MgCl₂ and 100 µg of protein in the presence or absence of ouabain (4mM) in a final volume of 200 µL. The reaction was started by the addition of ATP to a 3 mM final concentration. After 30 min at 37°C, the reaction was stopped by the addition of 50 µL of 50% (w/v) TCA. Saturating substrate concentrations were used, and the reaction was linear with protein and time. Appropriate controls were included in the assays for the non-enzymatic hydrolysis of ATP. The amount of inorganic phosphate (Pi) released was quantified colorimetrically, as previously described (Fiske and Subbarow, 1927), using KH₂PO₄ as the reference standard. The absorbance was measured at 630 nm. The specific Na⁺,K⁺-ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-insensitive activity from the overall activity (Total ATPase, in the absence of ouabain) and was expressed in nmol of Pi/mg of protein/min.

2.7 Quantification of oxidative stress biomarkers

2.7.1 Brain malondialdehyde (MDA) measurement

MDA levels were obtained from the cerebral cortex and hippocampus homogenate by methods described previously (Ohkawa et al., 1979) with a few modifications (Rossato et al., 2002). In short, the reaction mixture contained 50 μ l of homogenate or standard (MDA 0.03 mM), 50 μ L of 8.1% sodium dodecylsulfate (SDS), 150 μ l of acetic acid solution (2.5 M HCl, pH 3.5) and 150 μ l of 0.8% TBA. The mixtures were heated at 95°C for 90 min. After centrifugation at 1,700 g for 5 min, the absorbance was measured at 532 nm. The MDA tissue levels were expressed as μ mol MDA/ mg of protein.

2.7.2. Assay of NO_x (NO₂ plus NO₃)

For NO_x determination, an aliquot was homogenized (1:1) in 200 mM Zn₂SO₄ and acetonitrile. The sample was processed as previously described (Jaques et al., 2013). The homogenate was then centrifuged at 16,000 g for 30 min at 4°C, and the supernatant was separated for the NO_x content analysis as previously described (Miranda et al., 2001). Nitrite and nitrate solutions were used as the reference standards. NO_x concentrations were determined by the absorbance at 570 nm and were expressed as μ mol of NO_x/ mg of protein.

2.7.3 Carbonyl proteins

Measurement of total protein carbonyl content was determined by the method described by Yan et al. (1995) (Yan et al., 1995) and adapted for brain tissue by Oliveira et al. (2004) (Schneider Oliveira et al., 2004). Briefly, cerebral cortex and hippocampus homogenates were adjusted to 0.6 mg/ml of protein in each sample and 250 μ L aliquots were mixed with 50 μ L 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH, 10 mM) or 50 μ L ml HCl (2 M). After incubation at room temperature for 1 h in a dark environment, 125 μ L denaturing buffer (150 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, containing 3 % SDS), 500 μ L heptane (99.5 %), and 500 μ L ethanol (99.8 %) were added sequentially and mixed under vortex agitation for 40 s and centrifuged for 15 min. Afterwards, protein isolated from the interface was washed twice with 500 μ L ethyl acetate/ethanol 1:1 (v/v) and suspended in 500 μ L ml of denaturing buffer. Each DNPH sample was read at 370 nm in a Hitachi U-2001 spectrophotometer against the

corresponding HCl sample (blank) and total carbonylation was calculated using a molar extinction coefficient of $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, as previously describe (Levine et al., 1990).

2.8 Inflammatory cytokines

The cytokine quantification in the hippocampus was assessed by ELISA using commercial kits for IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ (eBIOSCIENCE, San Diego, USA), according to the manufacturer's instructions. Briefly, 96 well microplates were sensitized with the primary antibody at room temperature (RT) for 30 min, and then the sample was added and incubated (37°C for 30 min). After washing, the secondary antibody conjugated with peroxidase was added and incubated. The presence and concentration of the cytokines were determined by the intensity of the color measured by spectrometry in a micro ELISA reader. We determined the intra-assay and inter-assay coefficients of variation as follows: IL-1 β (5.4% and 5.9%), IL-6 (5.6% and 5.8%), IL-10 (5.3% and 5.7%), TNF- α (5.4% and 5.9%), and IFN- γ (4.7% and 5.2%).

2.9 Leukocyte infiltration markers

To estimate the inflammatory cell infiltration in the cerebral cortex and hippocampus, the samples were collected, and the activities of myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase), which are markers of neutrophil and macrophage infiltration, respectively, were determined (Lloret and Moreno, 1995; Silva et al., 2013). First, the samples were homogenized in Tris-HCl buffer (10 mM, pH 7.4) and EDTA (0.1 mM) containing 0.5% Hexadecyltrimethyl-ammonium bromide and centrifuged at 16,000 g at 4°C for 20 min; the supernatant was then collected. For the MPO activity measurement, 10 μL of supernatant were added to 200 μL of acetate buffer (200 mM, pH 5.4) and 20 μL of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (18.4 mM) in a 96-well plate and incubated at 37°C for 3 min in duplicate. To stop the reaction, the microplates were incubated in an ice bath, and 30 μL of acetic acid was added. The color formed was assessed at 630 nm.

For the measurement of NAGase activity, 25 μL of the supernatant were incubated with 25 μL of 4-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide (2.24 nM) and 100 μL of citrate buffer (50 mM, pH 4.5) at 37°C for 1 h. After incubation, 100 μL of glycine buffer (0.2 mM, pH 10.4) were added to stop the reaction and to allow for the development of color; it was measured at 405 nm. The absorbance of all reactions was

measured in a Fisher Biotech Microkinetics Reader BT 2000 microplate reader. The values are expressed as the optical densities corrected for the protein content.

2.10 Protein determination

Protein was measured by the Coomassie Blue method (Bradford, 1976), using bovine serum albumin as the standard.

2.11 Histopathological assessment

Perfusion and fixation of the brain were performed through trans-cardiac perfusion with 4% paraformaldehyde (in 0.9% sodium chloride and 4% sucrose from Sigma-Aldrich, Brazil), as previously described (Canas et al., 2009). Frozen brains were sectioned (30 μm coronal sections) using a cryostat Leica CM1850 (Leica Microsistemas, German), and the sections were mounted on slides coated with 2% gelatin plus 0.08% chromalin (chromium and potassium sulfate, from Sigma-Aldrich, Brazil), allowed to dry at room temperature and stored at -20°C until use. The brain slices were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded with paraffin and sections approximately 5 μm thick were excised, followed by hematoxylin and eosin (H&E) and cresyl violet staining of Nissl bodies, as previously described (Duarte et al., 2009).

2.12 Immunohistochemistry for CD11b

CD11b (rat monoclonal 5C6, 1:200; AbD Serotec, Oxford, UK) was carried out in free-floating sections by incubation at 4°C for 48 h in blocking solution with the primary antibodies. Sections were washed 3 times and incubated for 2 h at RT with the corresponding secondary antibodies coupled to fluorophores, namely goat anti-mouse or goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594 (1:200–1:1000; Molecular Probes – Invitrogen, Eugene, OR) diluted in the blocking solution. The sections were washed 3 times and then mounted with Dako fluorescent medium (Dako, USA) on gelatin-coated slides (Carmo et al., 2014).

2.13 Statistical analysis

Statistical analysis of tests was carried out by one or two-way ANOVA. $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference in all experiments. All data were expressed as the mean \pm SEM.

3. Results

3.1. ANT prevent impairment of memory and the hypothermic response induced by systemic LPS

Figure 1 shows the protective effect of ANT on learning and memory and on body temperature of mice after systemic administration of LPS. Graph 1A shows that a single administration of ANT 30 and 100 mg/kg (acute treatment) was not able to prevent the impairment induced by LPS in object recognition task [$P > 0.05$; graph 1A]. However, the treatment with ANT during 10 days showed that only ANT100 mg/kg was able to prevent the impairment of memory induced by LPS [$F_{(1,46)} = 11.97$, $P < 0.01$; graph 1B]. Both treatments were not able to alter the number of crossing and rearing in the test day to the object recognition [$P > 0.05$; graph 1C and 1D]. In relation to rectal temperature, can be seen that intraperitoneal LPS administration reduced the body temperature 2 [$F_{(5,49)} = 5.268$, $P < 0.01$; graph 1E] and 4 hours after administration [$F_{(5,49)} = 6.921$, $P < 0.001$; graph 1F]. Pretreatment with ANT100 during 10 days was able to prevent the hypothermic episode induced by LPS 2 [$F_{(1,28)} = 5.421$; $P < 0.05$; graph 1E] and 4 hours [$F_{(1,28)} = 43.32$; $P < 0.001$; graph 1F]. Body temperature alteration were not observed 24 hours after systemic administration of LPS [$P > 0.05$; graph 1G].

3.2 ANT do not protect the impairment in the total ATPase and Na^+, K^+ -ATPase activities induced by LPS in cerebral cortex and hippocampus.

We also investigated whether ANT or LPS could reduce total ATPase and Na^+, K^+ -ATPase activities in the cerebral cortex and hippocampus 4 and 24 hours after LPS-administration (see figure 2). It can be observed a reduction in the total ATPase [$F_{(5,56)} = 26.95$; $P < 0.001$, graph 2A] and Na^+, K^+ -ATPase activities [$F_{(5,56)} = 10.27$, $P < 0.001$; graph 2B] in cerebral cortex 4 hours post LPS-administration. No significant differences were observed at the time of 24 hours [$P > 0.05$, graphs 2C and 2D]. In addition, ANT was not able to restore the reduction in all enzyme activities. In relation to the hippocampus, it can be noted a reduction in the Na^+, K^+ -ATPase activity [$F_{(5,56)} = 7.690$, $P < 0.01$, graph 2H] only 24 hours after LPS administration. There were no protective effects of ANT on the enzymatic activity of the Na^+, K^+ -ATPase in the hippocampus [$P > 0.05$; graph 2H].

3.3 ANT prevent the oxidative stress induced by LPS in cerebral cortex and hippocampus

It can be seen that LPS administration increased the protein carbonyl content at 4 hours in the cerebral cortex [$F_{(5,41)}= 6.501$, $P<0.05$; graph 3A] and hippocampus [$F_{(5,41)}= 4.985$, $P <0.05$; graph 3B]. The same effect was observed at 24 hours in the cerebral cortex [$F_{(5,41)}= 4.995$, $P <0.05$; graph 3A] and hippocampus [$F_{(5,41)}= 4.581$; $P<0.05$; graph 3B]. ANT30 mg/kg prevented the increase in carbonyl protein only in the cerebral cortex 24 hours after LPS administration [$F_{(1,24)}= 4.880$, $P<0.05$; graph 3A]. ANT100 mg/kg prevented the increase in the carbonyl protein 4 hours in the cerebral cortex [$F_{(1,24)}= 5.021$, $P<0.05$, graph 3A] and hippocampus [$F_{(1,24)}= 4.659$, $P<0.05$; graph 3B]. The same effect was observed for 24 hours to cerebral cortex [$F_{(1,24)}= 5.254$, $P<0.05$; graph 3A] and hippocampus [$F_{(1,24)}= 5.221$, $P<0.05$; graph 3B].

The LPS administration increased the NO_x content in the cerebral cortex only at 4 hours [$F_{(5,41)}= 4.434$; $P<0.01$, graph 3C]. ANT30 [$F_{(1,24)}= 4.698$, $P <0.05$; graph 3C] and 100 mg/kg [$F_{(1,24)}= 4.909$, $P<0.05$; graph 3C] reversed this effect. In relation to the hippocampus, it can be seen an increase in the NO_x levels only at 24 hours [$F_{(5,41)}= 5.145$; $P<0.01$, graph 3D]. ANT100 mg/kg prevented the increase in the NO_x production in the hippocampus [$F_{(1,24)}= 5.218$, $P<0.01$; graph 3D].

LPS increased the TBARS content in the cerebral cortex at 4 [$F_{(5,41)}= 10.72$, $P<0.001$; graph 3E] and 24 hours [$F_{(5,41)}= 9.123$, $P<0.001$; graph 3F] post LPS administration. ANT100 mg/kg prevented the increase in the TBARS production in the cerebral cortex at 4 [$F_{(1,24)}= 4.902$, $P<0.05$; graph 3E] and 24 hours [$F_{(1,24)}= 5.022$, $P<0.05$; graph 3E]. LPS also increased the TBARS levels at 4 [$F_{(5,41)}= 5.705$, $P<0.01$; graph 3F] and 24 hours [$F_{(5,41)}= 8.402$, $P<0.01$; graph 3F] in the hippocampus. However, the protective effect of the ANT occurred only in the ANT100 mg/kg group at 24 hours [$F_{(1,24)}= 5.721$, $P <0.05$; graph 3F].

3.4 ANT protect against neuronal morphology alterations and release of pro-inflammatory mediators in the hippocampus induced by LPS.

LPS administration showed a marked alteration in the morphology of the hippocampal neurons in the CA1 and CA3 regions, but did not show an impaired neuronal viability by cresyl violet staining of Nissl bodies (24 hours, Figure 4A). In addition, ANT were able to prevent the alterations in the neuronal morphology. LPS also promoted an alteration in the hippocampus interleukins (IL) levels at 4 and 24

hours. It can be seen an increased content of IL-1 β [$F_{(3,19)}=101.6$, $P<0.001$, graph 4B, 4hours; $F_{(3,19)}=194.3$, $P<0.001$, graph 4B, 24 hours], IL-6 [$F_{(3,19)}=121.2$, $P<0.001$, graph 4C, 4 hours; $F_{(3,19)}=125.1$, $P<0.001$, graph 4C, 24 hours], TNF- α [$F_{(3,19)}=95.40$, $P<0.001$, graph 4E, 4 hours; $F_{(3,19)}=76.41$, $P<0.001$, graph 4E, 24 hours] and INF- γ [$F_{(3,19)}=106.0$, $P<0.001$, graph 4F, 4 hours; $F_{(3,19)}=160.7$, $P<0.001$, graph 4F, 24 hours]. In contrast, LPS reduced the IL-10 content at 4 [$F_{(3,19)}=33.19$, $P<0.001$, graph 4D] and 24 hours [$F_{(3,19)}=35.16$, $P<0.001$, graph 4D]. Significant effects of ANT100 mg/kg were observed for all IL analyzed. ANT 100 mg/kg significantly prevented the increase of IL-1 β [$F_{(3,19)}=101.6$, $P<0.001$, graph 4B, 4 hours; $F_{(3,19)}=194.3$, $P<0.001$, graph 4B, 24 hours], IL-6 [$F_{(3,19)}=121.2$, $P<0.001$, graph 4C, 4 hours; $F_{(3,19)}=125.1$, $P<0.001$, graph 4C, 24 hours], TNF- α [$F_{(3,19)}=95.40$, $P<0.001$, graph 4E, 4 hours; $F_{(3,19)}=76.41$, $P<0.001$, graph 4E, 24 hours] and INF- γ [$F_{(3,19)}=106.0$, $P<0.001$, graph 4F, 4 hours; $F_{(3,19)}=160.7$, $P<0.001$, graph 4F, 24 hours]. In addition, ANT100 mg/kg also prevented the decrease in the IL-10 content at 4 [$F_{(3,19)}=33.19$, $P<0.001$, graph 4D] and 24 hours [$F_{(3,19)}=35.16$, $P<0.001$, graph 4D]. ANT treatment showed a better effect to IL-1 β , IL-10 and TNF- α levels. ANT was not able to restore the concentrations of the IL to the baseline levels in the hippocampus. With respect to IL-6 and IFN- γ , the protective effect was more discreet.

3.5 ANT prevent the inflammatory cells infiltration and increase in the myeloperoxidase activity in the cerebral cortex and hippocampus 24 hours after LPS administration.

The histological analysis of the hippocampus shows that ANT100 mg/kg prevented migration of inflammatory cells into the CA3 region of the hippocampus 24 hours after LPS administration (5A). With respect to the enzymatic activity of specific markers for macrophages, it can be seen that LPS and ANT were not able to alter the NAGase activity at 4 and 24 hours after LPS administration in the cerebral cortex (5D and 5E) and hippocampus (5H and 5I). The same effect can be observed to myeloperoxidase activity at 4 hours in the cerebral cortex (5B) and hippocampus (5F). By contrast, ANT100 mg/kg was able to prevent the increase in myeloperoxidase activity 24 hours after LPS-injection to the cerebral cortex [$F_{(1,20)}=4.705$; $P<0.05$, graph 5C] and hippocampus [$F_{(1,20)}=5.700$; $P<0.05$, graph 5G]

3.6 ANT suppress the microglial hippocampal immunoreactivity 24 hours after LPS administration.

The identification of microglial cells was carried out by immunohistochemical detection of anti-CD11b, a validated marker of activated microglia cells. As presented in Figure 6, we can conclude that 24 h after administration of LPS, there is an increase in the immunofluorescence for CD11b in comparison with control group and, ANT 100mg/kg appear to reduce the immunoreactivity for CD11b, however, few regions show enlarged cell body with short and thick processes of microglia.

3.7 Main highlights of the protective effects of ANT in neuroinflammation induced by LPS.

A significant protector effect of ANT in the impairment of memory induced by LPS was observed. The neuroinflammation reduced the Na^+, K^+ -ATPase activity in the cerebral cortex and hippocampus. ANT were not able to prevent this effect, but reduced the oxidative stress markers MDA, protein carbonyl and NOx in the cerebral cortex and hippocampus. ANT reduced changes in the neurons morphology in CA1 and CA3 region of the hippocampus at 24 hours. In parallel, ANT suppressed the production of pro-inflammatory interleukins, especially IL-1 β and TNF- α , and the microglial immunoreactivity (see figure 7).

4. Discussion

In the current pharmacology, it is common to use of monotherapeutic drugs to treat neurodegeneration and neuroinflammation. However, this strategy is not considered the most effective treatment and the heterogeneous nature of encephalopathy associated with sepsis or even during neuroinflammation development in Alzheimer's or Parkinson's disease. In this respect, nutraceuticals or phytonutrients may be aimed at simultaneously treating different therapeutic targets with the least adverse effects representing a more effective therapy than monotherapy with drugs. Taking ownership this concept, our research group has carried out some studies highlighting the close interaction between the consumption of anthocyanins (ANT) with improved memory and the reduction of cognitive impairment associated with sporadic dementia of Alzheimer's type in rats (Gutierrez et al., 2014a; Gutierrez et al., 2014b; Gutierrez et al., 2012), and more recently we looked out the efficiency of ANT suppress the inflammatory cells infiltration in a focal demyelination model in rats (Carvalho et al., 2015). In this context, the next step was to determine or not if the ANT has the ability to

control inflammatory processes which lead to encephalopathy, using a lipopolysaccharide (LPS) as appropriate model for neuroinflammation in mice.

In this study we investigated the protective effect of ANT on the cognitive decline induced by an acute episode of sepsis. We found that pretreatment during 10 days with ANT 100 mg/kg was able to prevent an impairment of the discrimination index in the object recognition task in mice. In parallel, ANT 100 mg/kg was able to reduce the sickness behavior preventing the hypothermia episodes initiated 2 and 4 hours post LPS-administration. Evidences of the ANT protective properties on learning and memory have been described in the literature, although no study has focused for the neuroinflammation induced LPS. It has been reported that dietary supplementation of antioxidant-rich berries (e.g., blueberry, strawberry) can improve the learning and memory in the aged animal (Williams and Grayer, 2004; Williams et al., 2008). Furthermore, ANT was also able to improve memory of old rats in Morris water maze (Andres-Lacueva et al., 2005; Shukitt-Hale et al., 2005), of mice in the inhibitory avoidance task (Barros et al., 2006) and showed a cognitive improvement in older humans (Krikorian et al., 2010).

Gutierrez et. al. (2012) reported that a pretreatment with 200 mg/kg of ANT from the *Vitis vinifera* were able to prevent the impairment of memory induced by scopolamine. Interestingly in this study, ANT treatment was able to restore the activity of key-enzymes that control the cholinergic and purinergic neurotransmission, and reduce the oxidative stress and restore the activity of ions pump in brain tissues (Gutierrez et al., 2014a; Gutierrez et al., 2014b; Gutierrez et al., 2012). Among these ionic pumps we highlight the Na^+, K^+ -ATPase. It has been shown that Na^+, K^+ -ATPase can play a relevant role in neuronal and synaptic plasticity (Glushchenko and Izvarina, 1997; Scuri et al., 2007) and in the regulation of learning and memory performances (Brunelli et al., 1997; Wyse et al., 2004). In fact, a decreased in the activity or expression of this enzyme directly impairs neurotransmitter signaling, with deleterious consequences on behavior (dos Reis et al., 2002; Lingrel et al., 2007; Moseley et al., 2007), increases Ca^{2+} influx (Fujisawa et al., 1965; Xiao et al., 2002), glutamate release (Li and Stys, 2001) and causes hippocampal cell death in rats (Lees et al., 1990).

In our study was observed a reduction in the total ATPase and Na^+, K^+ -ATPase activities in the cerebral cortex at 4 hours post LPS-administration. In contrast, the same effects of LPS on the Na^+, K^+ -ATPase activity was seen at 24 hours. However, there were no protective effects of ANT on Na^+, K^+ -ATPase activity 4 and 24 hours. One

hypothesis to explain these results would be a reduction in enzyme expression in brain structures. In parallel, it is possible that the effect of LPS to reduce the Na^+/K^+ ATPase activity also occurs via activation of intracellular signaling promoting activation of protein kinases that phosphorylate different amino acid residues present in the enzyme (eg. PKA e PKC) (Cao et al., 2004; Suh et al., 2004). In this way, the lack of ANT protective effect on the inhibition of Na^+/K^+ ATPase activity by LPS could be related to its inability to prevent the activation of these protein kinases.

In the brain, the high content of polyunsaturated fatty acids and the high oxygen consumption are factors responsible for elevated susceptibility to reactive species damage. Oxidative stress is likely to have an important role in the development of a number of neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and MS (Sultana et al., 2013; Sutherland et al., 2013; Vida et al., 2014). LPS promoted an increase in the markers of oxidative/nitrosative, such as MDA, NOx and protein carbonyl content in the cerebral cortex and hippocampus at 4 and 24 hours. Previous studies also showed an increase in the oxidative stress markers of oxidative after LPS administration (Abdel-Salam et al., 2014; Swarnkar et al., 2009; Vasconcelos et al., 2015). In addition, the oral administration of ANT was able to prevent the damage in the lipid and protein content and reduce the NOx levels induced by LPS.

To date, it is unknown if the brain inflammation and oxidative damage are a direct consequence of systemic inflammation or if they are driven by resident brain cells, such as microglia and astrocytes. However, the activation of microglia is the main cellular source of oxidation products and pro-inflammatory molecules in the brain (Hayashi et al., 2008; Nakanishi et al., 2011). In fact, we found that LPS treatment changes the neurons morphology, especially in CA1 and CA3 regions of the hippocampus at 24 hours after administration. However, it was not found an impaired neuronal viability by cresyl violet staining of Nissl bodies. Furthermore, an increase in the IL-1 β , IL-6, TNF- α and INF- γ and a decrease in IL-10 levels were observed 4 and 24 hours post-LPS administration. The most prominent effect of ANT was the reduction of IL-1 β and elevation of IL-10 levels. The IL-1 β has been associated with the impairment in the cognitive process in inflammatory process (Barrientos et al., 2009; Barrientos et al., 2012; Barrientos et al., 2006; Barrientos et al., 2002). It has been reported that IL-1 β intra-hippocampal administration (3 and 24 hours) impairs the consolidation (Barrientos et al., 2002) and reconsolidation of memory in rats (Machado et al., 2015). In line with this view, it is plausible that the effect of ANT in suppressing

IL-1 β content can have a great contribution in the memory loss prevention in object recognition task. ANT partially reduced TNF- α , IL-6 and IFN- γ levels. *In vitro* studies have appointed that pretreating BV-2 microglia with blueberry extract or individual components of blueberry desensitized the microglia to the inflammatory actions of LPS (Carey et al., 2013).

Other evidences appointed that anti-inflammatory effects of ANT in macrophages occur by inhibiting NF- κ B nuclear translocation and COX-2 expression (Hou et al., 2005; Lee et al., 2014). Inflammatory infiltrates cells have an important role in neuroinflammation. In this context, we verified if inflammatory cells are present in hippocampus by hematoxylin and eosin staining (H&E). In fact, infiltrated cells were detected by H&E staining and we confirm our hypothesis by the increase in the myeloperoxidase activity, a marker for neutrophils, in cerebral cortex and hippocampus 24 hours after LPS administration. However, the ANT 100 mg/kg was able to prevent the increase of myeloperoxidase activity. A previous study also demonstrated neutrophils infiltrated in the cerebral cortex and hippocampus 6 hours after LPS administration in rats (Jeong et al., 2010).

An important result in this study is that ANT 100 mg/kg was able to reduce the microglial activation and restore de memory loss induced by LPS. Microglial cells play a pivotal role in the innate CNS immune response, and acts as the first line of defense against invading pathogens by facilitating neuroprotection and repair processes (Kreutzberg, 1996; Minghetti and Levi, 1998). As expected, abnormal activation of microglia was found in LPS treatment; and consequently, this event could induce a number of major cellular responses that play critical roles in the inflammatory responses pathogenesis (Rankine et al., 2006). A previous study showed that the inhibition of the microglia by an ICV injection of minocycline was able to decrease acute brain oxidative damage and inflammation as well as long-term cognitive impairment in sepsis survivors (Michels et al., 2015). Thus, compounds able to suppress microglial immunoreactivity play an important role in protecting against neuroinflammation and the ANT treatment have an important role in the control of neuroinflammation indicating that this compound is a promising therapeutic component for neurodegenerative diseases and related encephalopathy's with a high degree of inflammation.

Conflicts of Interest statement

There are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This study was supported by the Christian Hansen LTDA and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/n°115566/2013-9).

References

- Abdel-Salam, O.M., Youness, E.R., Mohammed, N.A., Morsy, S.M., Omara, E.A., Sleem, A.A., 2014. Citric acid effects on brain and liver oxidative stress in lipopolysaccharide-treated mice. *Journal of medicinal food* 17, 588-598.
- Abraham, J., Johnson, R.W., 2009. Central inhibition of interleukin-1beta ameliorates sickness behavior in aged mice. *Brain, behavior, and immunity* 23, 396-401.
- Allan, S.M., Rothwell, N.J., 2001. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nature reviews. Neuroscience* 2, 734-744.
- Allan, S.M., Rothwell, N.J., 2003. Inflammation in central nervous system injury. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 358, 1669-1677.
- Andres-Lacueva, C., Shukitt-Hale, B., Galli, R.L., Jauregui, O., Lamuela-Raventos, R.M., Joseph, J.A., 2005. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutritional neuroscience* 8, 111-120.
- Barrientos, R.M., Frank, M.G., Hein, A.M., Higgins, E.A., Watkins, L.R., Rudy, J.W., Maier, S.F., 2009. Time course of hippocampal IL-1 beta and memory consolidation impairments in aging rats following peripheral infection. *Brain, behavior, and immunity* 23, 46-54.
- Barrientos, R.M., Hein, A.M., Frank, M.G., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2012. Intracisternal interleukin-1 receptor antagonist prevents postoperative cognitive decline and neuroinflammatory response in aged rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 14641-14648.
- Barrientos, R.M., Higgins, E.A., Biedenkapp, J.C., Sprunger, D.B., Wright-Hardesty, K.J., Watkins, L.R., Rudy, J.W., Maier, S.F., 2006. Peripheral infection and aging interact to impair hippocampal memory consolidation. *Neurobiology of aging* 27, 723-732.
- Barrientos, R.M., Higgins, E.A., Sprunger, D.B., Watkins, L.R., Rudy, J.W., Maier, S.F., 2002. Memory for context is impaired by a post context exposure injection of interleukin-1 beta into dorsal hippocampus. *Behavioural brain research* 134, 291-298.
- Barros, D., Amaral, O.B., Izquierdo, I., Geracitano, L., do Carmo Bassols Raseira, M., Henriques, A.T., Ramirez, M.R., 2006. Behavioral and genoprotective effects of Vaccinium berries intake in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 84, 229-234.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- Brunelli, M., Garcia-Gil, M., Mozzachiodi, R., Scuri, R., Zaccardi, M.L., 1997. Neurobiological principles of learning and memory. *Archives italiennes de biologie* 135, 15-36.
- Canas, P.M., Porciuncula, L.O., Cunha, G.M., Silva, C.G., Machado, N.J., Oliveira, J.M., Oliveira, C.R., Cunha, R.A., 2009. Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 14741-14751.
- Cao, A., Ramos Martinez, J.I., Barcia, R., 2004. Implication of PKA and PKC in the activation of the haemocytetes of *Mytilus galloprovincialis* Lmk by LPS and IL-2. *Molecular immunology* 41, 45-52.

- Carey, A.N., Fisher, D.R., Rimando, A.M., Gomes, S.M., Bielinski, D.F., Shukitt-Hale, B., 2013. Stilbenes and anthocyanins reduce stress signaling in BV-2 mouse microglia. *Journal of agricultural and food chemistry* 61, 5979-5986.
- Carmo, M.R., Simoes, A.P., Fonteles, A.A., Souza, C.M., Cunha, R.A., Andrade, G.M., 2014. ATP P2Y1 receptors control cognitive deficits and neurotoxicity but not glial modifications induced by brain ischemia in mice. *The European journal of neuroscience* 39, 614-622.
- Carvalho, F.B., Gutierrez, J.M., Bohnert, C., Zago, A.M., Abdalla, F.H., Vieira, J.M., Palma, H.E., Oliveira, S.M., Spanevello, R.M., Duarte, M.M., Lopes, S.T., Aiello, G., Amaral, M.G., Pippi, N.L., Andrade, C.M., 2015. Anthocyanins suppress the secretion of proinflammatory mediators and oxidative stress, and restore ion pump activities in demyelination. *The Journal of nutritional biochemistry* 26, 378-390.
- Carvalho, F.B., Mello, C.F., Marisco, P.C., Tonello, R., Girardi, B.A., Ferreira, J., Oliveira, M.S., Rubin, M.A., 2012. Spermidine decreases Na(+),K(+)-ATPase activity through NMDA receptor and protein kinase G activation in the hippocampus of rats. *European journal of pharmacology* 684, 79-86.
- Di Filippo, M., Chiasserini, D., Gardoni, F., Viviani, B., Tozzi, A., Giampa, C., Costa, C., Tantucci, M., Zianni, E., Boraso, M., Siliquini, S., de Iure, A., Ghiglieri, V., Colcelli, E., Baker, D., Sarchielli, P., Fusco, F.R., Di Luca, M., Calabresi, P., 2013. Effects of central and peripheral inflammation on hippocampal synaptic plasticity. *Neurobiology of disease* 52, 229-236.
- dos Reis, E.A., de Oliveira, L.S., Lamers, M.L., Netto, C.A., Wyse, A.T., 2002. Arginine administration inhibits hippocampal Na(+),K(+)-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. *Brain research* 951, 151-157.
- Duarte, J.M., Carvalho, R.A., Cunha, R.A., Gruetter, R., 2009. Caffeine consumption attenuates neurochemical modifications in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of neurochemistry* 111, 368-379.
- Fan, L., Wang, T., Chang, L., Song, Y., Wu, Y., Ma, D., 2014. Systemic inflammation induces a profound long term brain cell injury in rats. *Acta neurobiologiae experimentalis* 74, 298-306.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y., 1927. The Nature of the "Inorganic Phosphate" in Voluntary Muscle. *Science* 65, 401-403.
- Francois, A., Terro, F., Quellard, N., Fernandez, B., Chassaing, D., Janet, T., Rioux Bilan, A., Paccalin, M., Page, G., 2014. Impairment of autophagy in the central nervous system during lipopolysaccharide-induced inflammatory stress in mice. *Molecular brain* 7, 56.
- Fujisawa, H., Kajikawa, K., Ohi, Y., Hashimoto, Y., Yoshida, H., 1965. Movement of radioactive calcium in brain slices and influences on it of protoveratrine, ouabain, potassium chloride and cocaine. *Japanese journal of pharmacology* 15, 327-334.
- Glushchenko, T.S., Izvarina, N.L., 1997. Na⁺,K⁺-ATPase activity in neurons and glial cells of the olfactory cortex of the rat brain during the development of long-term potentiation. *Neuroscience and behavioral physiology* 27, 49-52.
- Granger, J.I., Ratti, P.L., Datta, S.C., Raymond, R.M., Opp, M.R., 2013. Sepsis-induced morbidity in mice: effects on body temperature, body weight, cage activity, social behavior and cytokines in brain. *Psychoneuroendocrinology* 38, 1047-1057.
- Gutierrez, J.M., Carvalho, F.B., Schetinger, M.R., Agostinho, P., Marisco, P.C., Vieira, J.M., Rosa, M.M., Bohnert, C., Rubin, M.A., Morsch, V.M., Spanevello, R., Mazzanti, C.M., 2014a. Neuroprotective effect of anthocyanins on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia in

- rats. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 33, 88-97.
- Gutierrez, J.M., Carvalho, F.B., Schetinger, M.R., Marisco, P., Agostinho, P., Rodrigues, M., Rubin, M.A., Schmatz, R., da Silva, C.R., de, P.C.G., Farias, J.G., Signor, C., Morsch, V.M., Mazzanti, C.M., Bogo, M., Bonan, C.D., Spanevello, R., 2014b. Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. *Life sciences* 96, 7-17.
- Gutierrez, J.M., Carvalho, F.B., Schetinger, M.R., Rodrigues, M.V., Schmatz, R., Pimentel, V.C., Vieira, J.M., Rosa, M.M., Marisco, P., Ribeiro, D.A., Leal, C., Rubin, M.A., Mazzanti, C.M., Spanevello, R., 2012. Protective effects of anthocyanins on the ectonucleotidase activity in the impairment of memory induced by scopolamine in adult rats. *Life sciences* 91, 1221-1228.
- Hayashi, Y., Yoshida, M., Yamato, M., Ide, T., Wu, Z., Ochi-Shindou, M., Kanki, T., Kang, D., Sunagawa, K., Tsutsui, H., Nakanishi, H., 2008. Reverse of age-dependent memory impairment and mitochondrial DNA damage in microglia by an overexpression of human mitochondrial transcription factor a in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 8624-8634.
- Henry, C.J., Huang, Y., Wynne, A., Hanke, M., Himler, J., Bailey, M.T., Sheridan, J.F., Godbout, J.P., 2008. Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *Journal of neuroinflammation* 5, 15.
- Hou, D.X., Yanagita, T., Uto, T., Masuzaki, S., Fujii, M., 2005. Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: structure-activity relationship and molecular mechanisms involved. *Biochemical pharmacology* 70, 417-425.
- Jacewicz, M., Czapski, G.A., Katkowska, I., Strosznajder, R.P., 2009. Systemic administration of lipopolysaccharide impairs glutathione redox state and object recognition in male mice. The effect of PARP-1 inhibitor. *Folia neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences* 47, 321-328.
- Jaeger, L.B., Dohgu, S., Sultana, R., Lynch, J.L., Owen, J.B., Erickson, M.A., Shah, G.N., Price, T.O., Fleegal-Demotta, M.A., Butterfield, D.A., Banks, W.A., 2009. Lipopolysaccharide alters the blood-brain barrier transport of amyloid beta protein: a mechanism for inflammation in the progression of Alzheimer's disease. *Brain, behavior, and immunity* 23, 507-517.
- Jaques, J.A., Doleski, P.H., Castilhos, L.G., da Rosa, M.M., Souza Vdo, C., Carvalho, F.B., Marisco, P., Thorstenberg, M.L., Rezer, J.F., Ruchel, J.B., Coradini, K., Beck, R.C., Rubin, M.A., Schetinger, M.R., Leal, D.B., 2013. Free and nanoencapsulated curcumin prevents cigarette smoke-induced cognitive impairment and redox imbalance. *Neurobiology of learning and memory* 100, 98-107.
- Jeong, H.K., Jou, I., Joe, E.H., 2010. Systemic LPS administration induces brain inflammation but not dopaminergic neuronal death in the substantia nigra. *Experimental & molecular medicine* 42, 823-832.
- Kielian, T., 2006. Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *Journal of neuroscience research* 83, 711-730.
- Kranjac, D., Koster, K.M., Kahn, M.S., Eimerbrink, M.J., Womble, B.M., Cooper, B.G., Chumley, M.J., Boehm, G.W., 2013. Peripheral administration of D-

- cycloserine rescues memory consolidation following bacterial endotoxin exposure. *Behavioural brain research* 243, 38-43.
- Kreutzberg, G.W., 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences* 19, 312-318.
- Krikorian, R., Shidler, M.D., Nash, T.A., Kalt, W., Vinqvist-Tymchuk, M.R., Shukitt-Hale, B., Joseph, J.A., 2010. Blueberry supplementation improves memory in older adults. *Journal of agricultural and food chemistry* 58, 3996-4000.
- Lee, S.G., Kim, B., Yang, Y., Pham, T.X., Park, Y.K., Manatou, J., Koo, S.I., Chun, O.K., Lee, J.Y., 2014. Berry anthocyanins suppress the expression and secretion of proinflammatory mediators in macrophages by inhibiting nuclear translocation of NF-kappaB independent of NRF2-mediated mechanism. *The Journal of nutritional biochemistry* 25, 404-411.
- Lees, G.J., Lehmann, A., Sandberg, M., Hamberger, A., 1990. The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. *Neuroscience letters* 120, 159-162.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology* 186, 464-478.
- Li, S., Stys, P.K., 2001. Na(+)-K(+)-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na(+)-dependent transport in spinal cord white matter. *Neuroscience* 107, 675-683.
- Lingrel, J.B., Williams, M.T., Vorhees, C.V., Moseley, A.E., 2007. Na,K-ATPase and the role of alpha isoforms in behavior. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 39, 385-389.
- Lloret, S., Moreno, J.J., 1995. Effects of an anti-inflammatory peptide (antiflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. *Biochemical pharmacology* 50, 347-353.
- Machado, I., Gonzalez, P.V., Vilcaes, A., Carniglia, L., Schioth, H.B., Lasaga, M., Scimonelli, T.N., 2015. Interleukin-1beta-induced memory reconsolidation impairment is mediated by a reduction in glutamate release and zif268 expression and alpha-melanocyte-stimulating hormone prevented these effects. *Brain, behavior, and immunity* 46, 137-146.
- Marisco, P.C., Carvalho, F.B., Rosa, M.M., Girardi, B.A., Gutierrez, J.M., Jaques, J.A., Salla, A.P., Pimentel, V.C., Schetinger, M.R., Leal, D.B., Mello, C.F., Rubin, M.A., 2013. Piracetam prevents scopolamine-induced memory impairment and decrease of NTPDase, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase activities. *Neurochemical research* 38, 1704-1714.
- McGhie, T.K., Walton, M.C., 2007. The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Molecular nutrition & food research* 51, 702-713.
- Michels, M., Vieira, A.S., Vuolo, F., Zapelini, H.G., Mendonca, B., Mina, F., Dominguni, D., Steckert, A., Schuck, P.F., Quevedo, J., Petronilho, F., Dal-Pizzol, F., 2015. The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment. *Brain, behavior, and immunity* 43, 54-59.
- Miklossy, J., 2008. Chronic inflammation and amyloidogenesis in Alzheimer's disease - role of Spirochetes. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 13, 381-391.
- Minghetti, L., Levi, G., 1998. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Progress in neurobiology* 54, 99-125.

- Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A., 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 5, 62-71.
- Miyazawa, T., Nakagawa, K., Kudo, M., Muraishi, K., Someya, K., 1999. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *Journal of agricultural and food chemistry* 47, 1083-1091.
- Mohebiany, A.N., Schneider, R., 2013. Glutamate excitotoxicity in the cerebellum mediated by IL-1beta. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 18353-18355.
- Morazzoni, P., Livio, S., Scilingo, A., Malandrino, S., 1991. Vaccinium myrtillus anthocyanosides pharmacokinetics in rats. *Arzneimittel-Forschung* 41, 128-131.
- Moseley, A.E., Williams, M.T., Schaefer, T.L., Bohanan, C.S., Neumann, J.C., Behbehani, M.M., Vorhees, C.V., Lingrel, J.B., 2007. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 616-626.
- Nakanishi, H., Hayashi, Y., Wu, Z., 2011. The role of microglial mtDNA damage in age-dependent prolonged LPS-induced sickness behavior. *Neuron glia biology* 7, 17-23.
- Noble, F., Rubira, E., Boulanouar, M., Palmier, B., Plotkine, M., Warnet, J.M., Marchand-Leroux, C., Massicot, F., 2007. Acute systemic inflammation induces central mitochondrial damage and mnesic deficit in adult Swiss mice. *Neuroscience letters* 424, 106-110.
- Rankine, E.L., Hughes, P.M., Botham, M.S., Perry, V.H., Felton, L.M., 2006. Brain cytokine synthesis induced by an intraparenchymal injection of LPS is reduced in MCP-1-deficient mice prior to leucocyte recruitment. *The European journal of neuroscience* 24, 77-86.
- Rivest, S., 2003. Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain, behavior, and immunity* 17, 13-19.
- Rossato, J.I., Zeni, G., Mello, C.F., Rubin, M.A., Rocha, J.B., 2002. Ebselen blocks the quinolinic acid-induced production of thiobarbituric acid reactive species but does not prevent the behavioral alterations produced by intra-striatal quinolinic acid administration in the rat. *Neuroscience letters* 318, 137-140.
- Santana Fruhauf, P., Porto Ineu, R., Tomazi, L., Duarte, T., Mello, C., Rubin, M., 2015. Spermine reverses lipopolysaccharide-induced memory deficit in mice. *Journal of neuroinflammation* 12, 3.
- Schneider Oliveira, M., Flavia Furian, A., Freire Royes, L.F., Rechia Figuera, M., de Carvalho Myskiw, J., Gindri Fiorenza, N., Mello, C.F., 2004. Ascorbate modulates pentylene-tetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience* 128, 721-728.
- Scuri, R., Lombardo, P., Cataldo, E., Ristori, C., Brunelli, M., 2007. Inhibition of Na⁺/K⁺ ATPase potentiates synaptic transmission in tactile sensory neurons of the leech. *The European journal of neuroscience* 25, 159-167.
- Shukitt-Hale, B., Galli, R.L., Meterko, V., Carey, A., Bielinski, D.F., McGhie, T., Joseph, J.A., 2005. Dietary supplementation with fruit polyphenolics ameliorates age-related deficits in behavior and neuronal markers of inflammation and oxidative stress. *Age (Dordr)* 27, 49-57.
- Silva, M.A., Trevisan, G., Klafke, J.Z., Rossato, M.F., Walker, C.I., Oliveira, S.M., Silva, C.R., Boligon, A.A., Flores, F.C., de Bona Silva, C., Athayde, M.L.,

- Ferreira, J., 2013. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Aloe saponaria* Haw on thermal injury in rats. *Journal of ethnopharmacology* 146, 393-401.
- Suh, H.W., Choi, S.S., Lee, J.K., Lee, H.K., Han, E.J., Lee, J., 2004. Regulation of c-fos and c-jun gene expression by lipopolysaccharide and cytokines in primary cultured astrocytes: effect of PKA and PKC pathways. *Archives of pharmacal research* 27, 396-401.
- Sultana, R., Perluigi, M., Allan Butterfield, D., 2013. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free radical biology & medicine* 62, 157-169.
- Sutherland, G.T., Chami, B., Youssef, P., Witting, P.K., 2013. Oxidative stress in Alzheimer's disease: Primary villain or physiological by-product? *Redox report : communications in free radical research* 18, 134-141.
- Swarnkar, S., Tyagi, E., Agrawal, R., Singh, M.P., Nath, C., 2009. A comparative study on oxidative stress induced by LPS and rotenone in homogenates of rat brain regions. *Environmental toxicology and pharmacology* 27, 219-224.
- Vasconcelos, A.R., Kinoshita, P.F., Yshii, L.M., Marques Orellana, A.M., Bohmer, A.E., de Sa Lima, L., Alves, R., Andreotti, D.Z., Marcourakis, T., Scavone, C., Kawamoto, E.M., 2015. Effects of intermittent fasting on age-related changes on Na,K-ATPase activity and oxidative status induced by lipopolysaccharide in rat hippocampus. *Neurobiology of aging* 36, 1914-1923.
- Vida, C., Gonzalez, E.M., Fuente, M.D., 2014. Increase of Oxidation and Inflammation in Nervous and Immune Systems with Aging and Anxiety. *Current pharmaceutical design*.
- Williams, C.A., Grayer, R.J., 2004. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural product reports* 21, 539-573.
- Williams, C.M., El Mohsen, M.A., Vauzour, D., Rendeiro, C., Butler, L.T., Ellis, J.A., Whiteman, M., Spencer, J.P., 2008. Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Free radical biology & medicine* 45, 295-305.
- Wyse, A.T., Bavaresco, C.S., Reis, E.A., Zugno, A.I., Tagliari, B., Calcagnotto, T., Netto, C.A., 2004. Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus. *Physiology & behavior* 80, 475-479.
- Xiao, A.Y., Wei, L., Xia, S., Rothman, S., Yu, S.P., 2002. Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 1350-1362.
- Yan, L.J., Traber, M.G., Packer, L., 1995. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Analytical biochemistry* 228, 349-351.

Legends

Figure 1. Protective effects of anthocyanins (ANT, 30 – 100 mg/kg) treatment on the memory loss induced by LPS (250 µg/kg, intraperitoneally) in mice in the object recognition task. (A) Effect of a single dose of ANT (30 - 100 mg/kg) on the impairment of memory induced by LPS administration (n=8). (B) Effect of pretreatment during 10 days with ANT in the impairment of memory induced by LPS (n=12-13). Effects of ANT and LPS in the crossing (C) and rearing numbers (D). Effect of ANT and LPS administration in the rectal temperature at 2 (E), 4 (F) and 24 (G) hours post-administration (n=7-9). * Denotes a significant difference from the vehicle group. # Denotes a significant difference compared with the LPS group (ANOVA one-way or two followed by post-hoc SNK).

Figure 2. Protective effects of anthocyanins (ANT, 30 – 100 mg/kg) treatment during 10 days on the oxidative stress parameters in the cerebral cortex and hippocampus of mice at 4 and 24 hours post LPS-administration (250 µg/kg, intraperitoneally). Carbonyl protein levels in the cerebral cortex (A) and hippocampus (B) of mice treated with ANT and LPS. NOx levels in the cerebral cortex (C) and hippocampus (D) of mice treated with ANT and LPS. MDA levels in the cerebral cortex (E) and hippocampus (F) of mice treated with ANT and LPS. * Denotes a significant difference from the vehicle group. # Denotes a significant difference compared with the LPS group (ANOVA one-way or two followed by post-hoc SNK, n = 7).

Figure 3. Total ATPase (A,C,E and G) and Na⁺,K⁺-ATPase (B,D,F and H) activities in the cerebral cortex (A,B,C and D) and hippocampus (E, F, G and H) of mice exposed to LPS (250 µg/kg, intraperitoneally) and treated with anthocyanins (ANT, 30 - 100 mg/kg) during 10 days. * Denotes a significant difference from the vehicle group. # Denotes a significant difference compared with the LPS group (ANOVA one-way or two followed by post-hoc SNK, n = 9-10).

Figure 4. Anthocyanins (ANT, 100mg/kg) prevent alterations in the neuronal morphology (A) and reduce the production of pro-inflammatory cytokines in the hippocampus of mice exposed to LPS (250 µg/kg, intraperitoneally). (B) IL-1β content, (C) IL-6 content, (D) IL-10 content, (D) TNF-α and (E) INF-γ. * Denotes a significant

difference from the vehicle group. # Denotes a significant difference compared with the LPS group (ANOVA one-way followed by post-hoc SNK, n =5).

Figure 5. (A) Protective effects of anthocyanins (ANT, 100 mg/kg) on the cellular infiltration in the CA3 region at 24 hours after LPS administration (n=3). Effects of ANT treatment (30-100 mg/kg) on the myeloperoxidase (B,C,F and G) and NAGase (D,E, H and I) activities in the cerebral cortex and hippocampus of mice 4 and 24 hours post LPS-administration. * Denotes a significant difference from the vehicle group. # Denotes a significant difference compared with the LPS group (ANOVA one or two-way followed by post-hoc SNK, n =6).

Figure 6. Protective effects of anthocyanins (ANT, 100 mg/kg) on the microglial hippocampal immunoreactivity in the CA3 region at 24 hours after LPS administration (n=3).

Figure 7. Overview of ANT benefits on the neuroinflammation induced by LPS administration in C57BL6 mice.

Figure 2

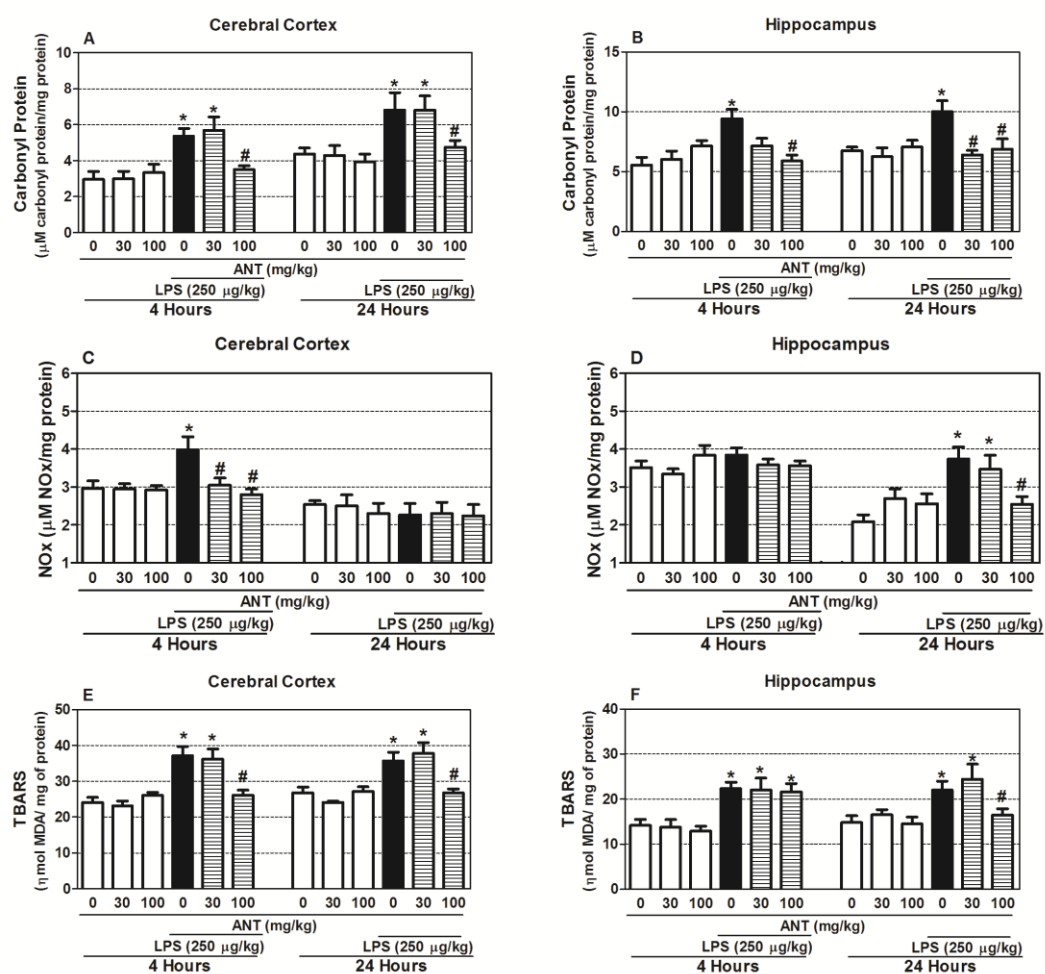


Figure 3

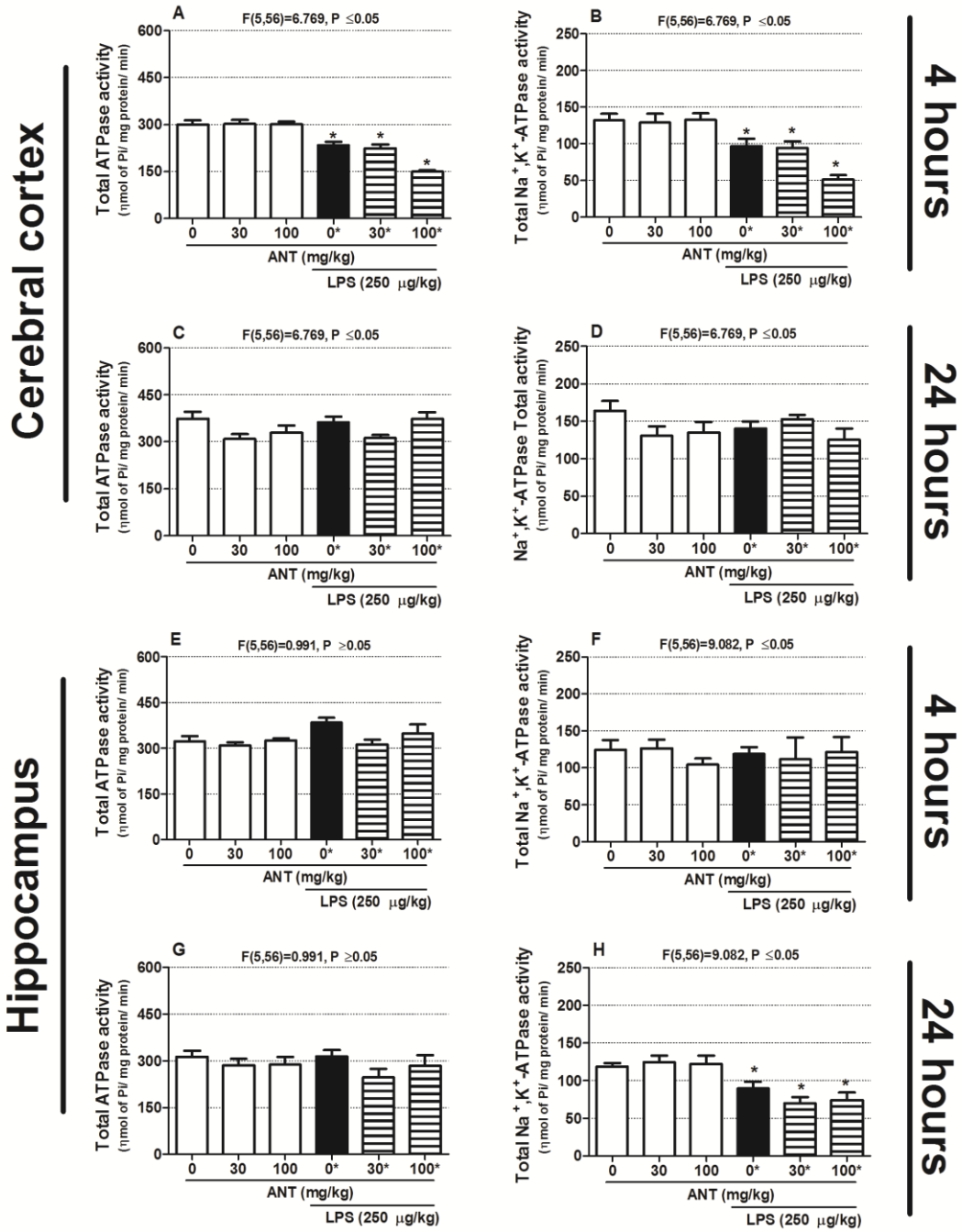
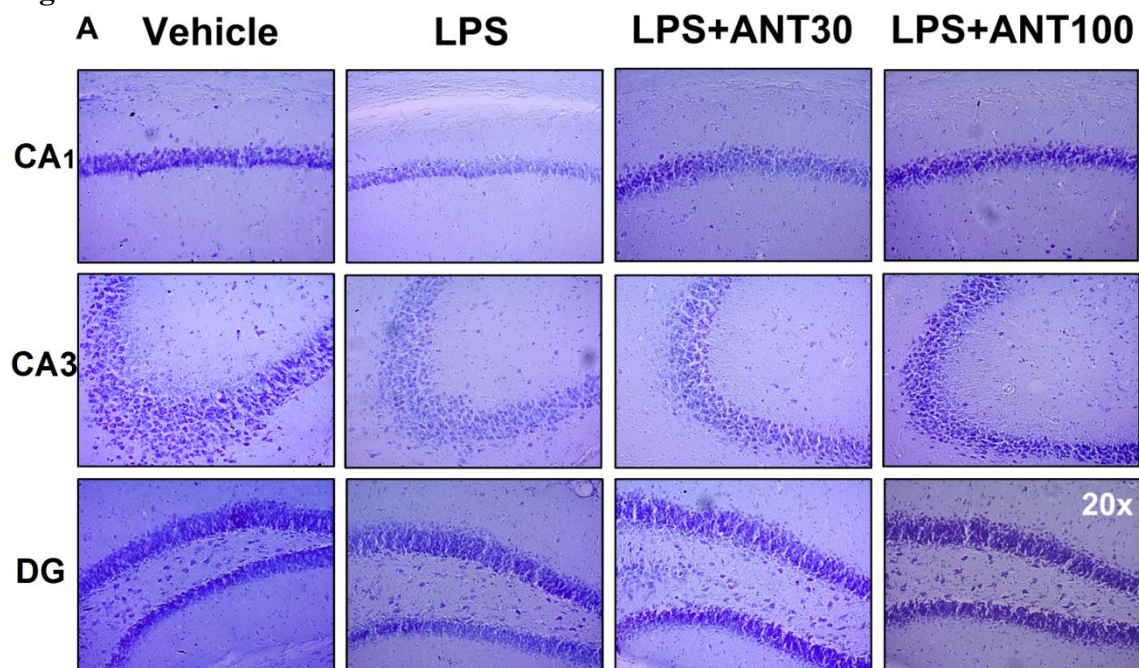


Figure 4



Hippocampus

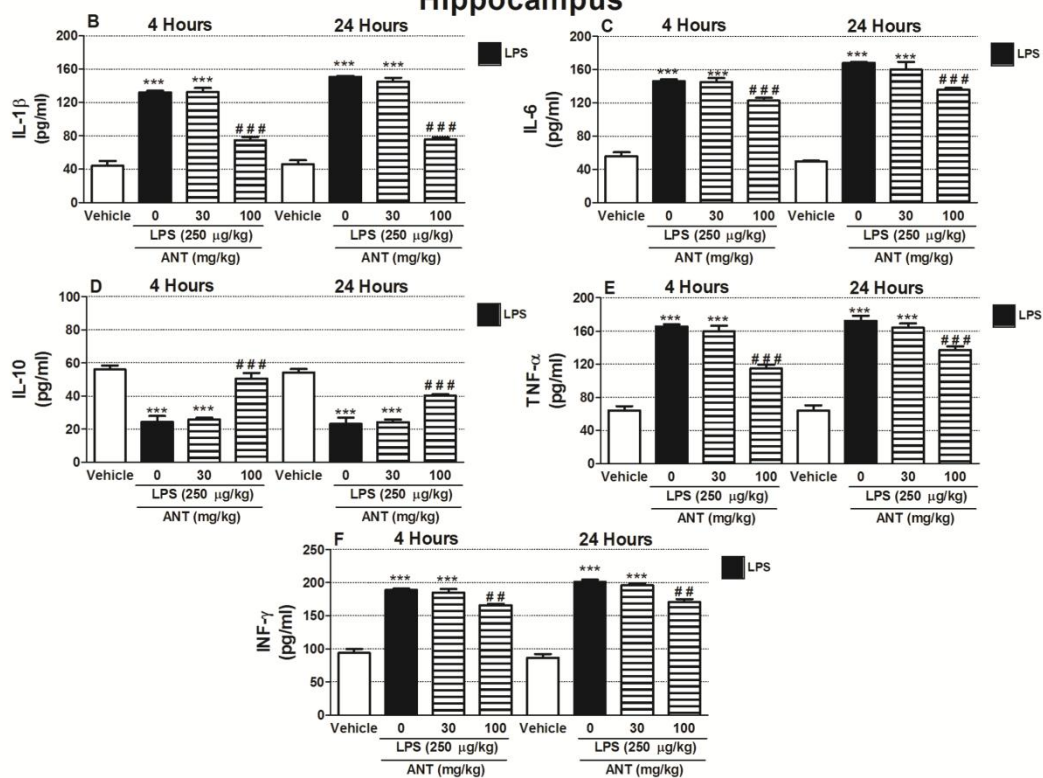


Figure 5

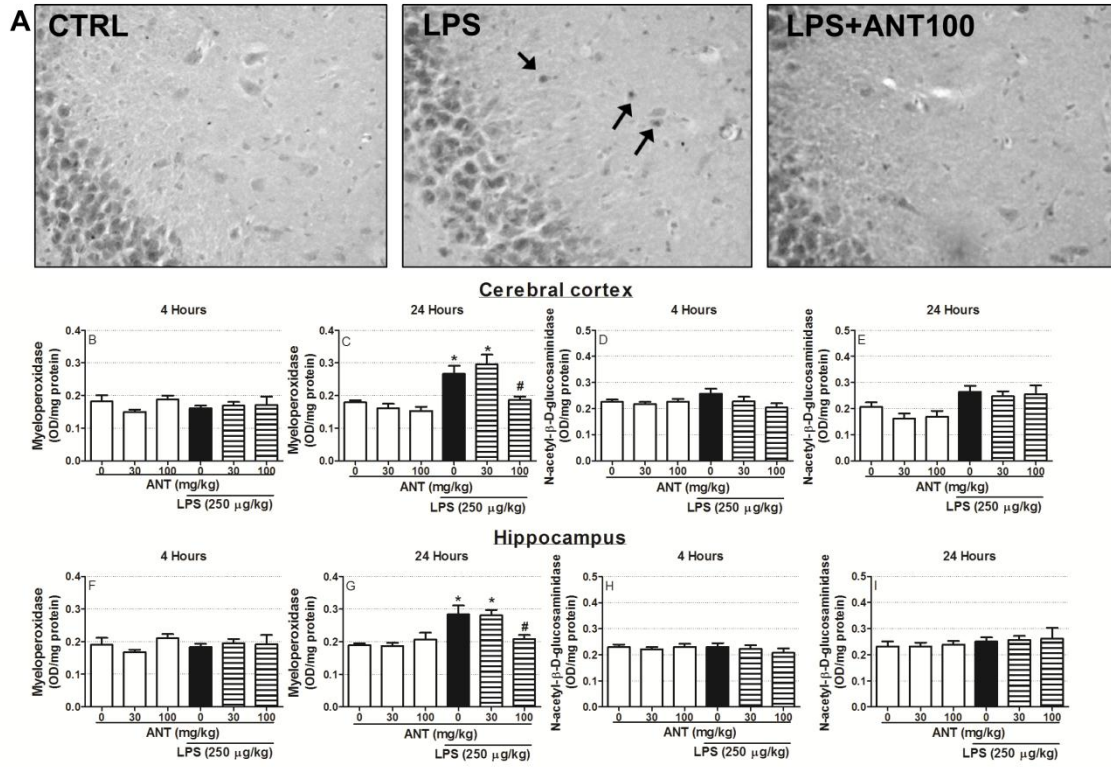


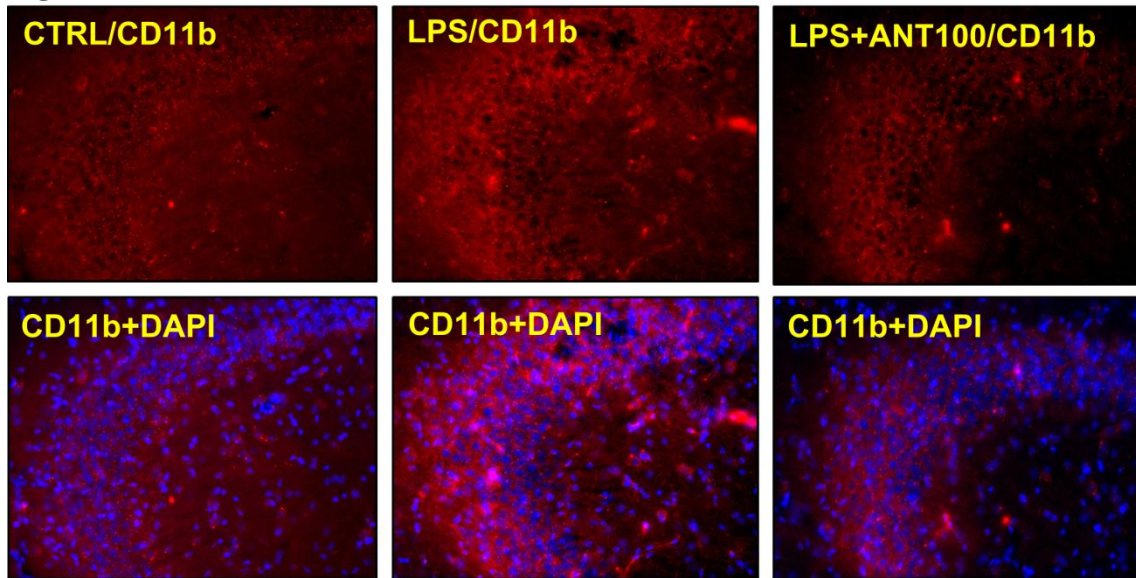
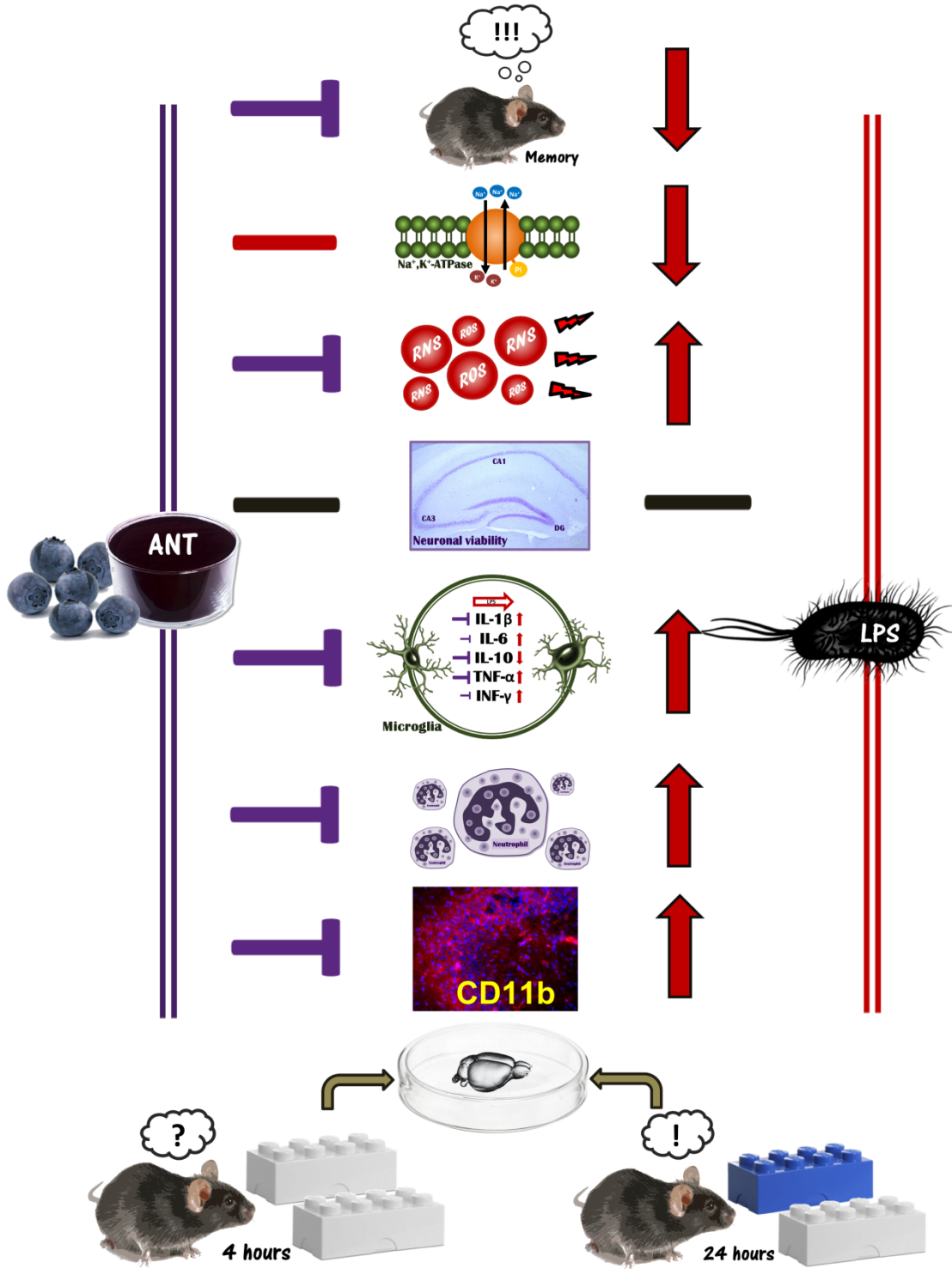
Figure 6

Figure 7



4 DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

A dieta é um dos principais fatores que afeta direta e consideravelmente a saúde humana. Além disso, os nutracêuticos podem atuar como suplementos coadjuvantes na prevenção e no tratamento de inúmeras doenças. Uma vez que os nutracêuticos são enriquecidos com antocianinas, é possível atingir uma dose que dificilmente seria obtida somente da alimentação. À medida que a humanidade caminha para um aumento na expectativa de vida, as doenças que acometem o SNC começam a se expandir na população. Em virtude disso, organizações de saúde ao redor do mundo recomendam um aumento na ingestão de alimentos derivados de plantas com o propósito de melhorar o estado de saúde e prevenir o desenvolvimento de doenças (ESPIN; GARCIA-CONESA; TOMAS-BARBERAN, 2007; CHAUHAN; MEHLA, 2015).

Na farmacologia atual, é comum o uso de drogas monoterapêuticas para o tratamento de processos neuroinflamatórios, desmielinizantes e degenerativos. Talvez, esta possa não ser a única forma eficaz para tratar a desmielinização ou mesmo o desenvolvimento de um processo de inflamação do sistema nervoso. A EM é uma doença de alta complexidade e que se enquadra neste contexto. Sabe-se que é uma patologia crônico-progressiva caracterizada por uma neuroinflamação recorrente e consequente desmielinização dos axônios dos neurônios no SNC e SNP (GOLDENBERG, 2012; GUIMARAES; SA, 2012; KIPP; VAN DER VALK; AMOR, 2012).

Tendo em vista que a EM é uma doença que não possui cura definida e nem um fármaco disponível atualmente e capaz de impedir o desenvolvimento e progressão desta doença, a busca de novos agentes que contribuam na qualidade de vida dos pacientes e que atuem no controle dos surtos assume uma grande relevância. Tomando posse deste conceito, o presente estudo associou o consumo de antocianinas com a regulação dos processos de neuroinflamação e de desmielinização no SNC de roedores. Uma representação deste propósito foi esquematizada na figura 8, afim de elucidar as diferenças entre os indutores de desmielinização e neuronflamação, os modelos animais utilizados e os mecanismos e alvos de indução em cada processo patológico.

O modelo experimental de desmielinização pelo BE mimetiza mudanças morfológicas, enzimáticas e celulares provenientes da destruição da bainha de mielina e de danos axonais. Estes eventos ocorrem devido a gliotoxicidade do BE que leva a destruição de células gliais,

especialmente oligodendrócitos. O enfoque do uso das antocianinas para este modelo foi verificar se esse composto é capaz de impedir a perda de mielina e suprimir marcadores de inflamação e de estresse oxidativo no tronco encefálico, mais especificamente na região da ponte, em ratos *Wistar* (BONDAN et al., 2000; GRACA et al., 2001; SANCHEZ et al., 2006).

A neuroinflamação induzida pelo LPS não representa um modelo específico para a EM. Este modelo está mais associado a estudos de comportamento doentio apresentados em casos de sepse e encefalopatia infecciosa. No entanto, um protocolo de neuroinflamação utilizando LPS como agente indutor foi utilizado para verificar se as antocianinas conseguem suprimir e/ou reduzir células infiltradas e a produção de mediadores pró-inflamatórios no SNC sem o desenvolvimento de um processo desmielinizante. É importante destacar que nas fases iniciais da EM, o primeiro evento que ocorre é o processo inflamatório. Em decorrência disto, dependendo da gravidade e extensão deste processo, a morte dos oligodendrócitos e células de *Schwann* ocorre progressivamente. A relevância deste trabalho se deve também ao fato de utilizar um modelo de neuroinflamação induzido pelo LPS para descobrir se as antocianinas podem suprimir um processo inflamatório no sistema nervoso por mecanismos não-dependentes da toxicidade do BE, e sim por respostas mediadas pela hiperestimulação dos TLR₄ e aumento da atividade microglial sem morte de oligodendrócitos e perda de mielina (figura 8).

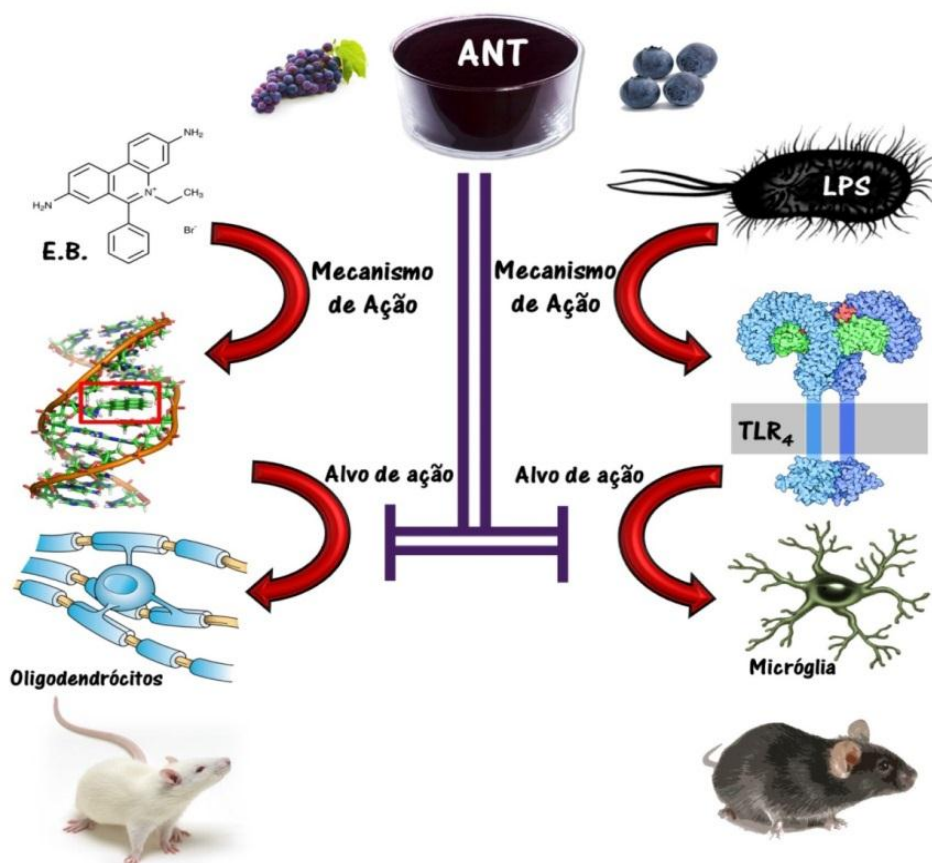


Figura 8 – Desmielinização e Neuroinflamação: Informações sobre os protocolos experimentais do presente estudo

Uma constatação recorrente em nosso trabalho é que os efeitos protetores das antocianinas sempre se mostraram na maior dose. Portanto, 100 mg/kg foi sempre a mais eficaz para os parâmetros estudados em ambos os protocolos testados. Os principais achados do presente estudo foram organizados em um esquema que poderá ser encontrado na figura 9 desta discussão.

No primeiro protocolo experimental foi verificado que a desmielinização na ponte de ratos reduziu a atividade das enzimas Na^+, K^+ -ATPase e Ca^{2+} -ATPase. Além disso, foi encontrado também um aumento considerável no conteúdo dos marcadores de estresse oxidativo como MDA, proteína carbonil e NOx, bem como uma redução de GSH e NPSH e na atividade da enzima superóxido dismutase. Correlações negativas entre um aumento dos marcadores de estresse oxidativo e uma redução da atividade das bombas iônicas foi significativo. Dentre estas análises, o aumento no conteúdo de MDA, um dos metabólitos formados no processo da peroxidação lipídica, mostrou correlação negativa para ambas as bombas iônicas. Em virtude destas enzimas serem ancoradas a membranas biológicas,

alterações na sua integridade provenientes da oxidação de fosfolípidos por espécies reativas podem interferir na estabilização do ancoramento destas enzimas e com isso alterar a sua conformação estrutural. É reconhecido que estes eventos podem piorar a atividade enzimática, uma vez que as enzimas Na^+, K^+ -ATPase e Ca^{2+} -ATPase não realizam os passos catalíticos necessários para o transporte de íons através da membrana (HABECK et al., 2015). Além disso, a redução na atividade da Na^+, K^+ -ATPase mostrou correlação negativa para a proteína carbonil e produção de NOx. Estes dados mostram uma maior sensibilidade da Na^+, K^+ -ATPase em relação a produção de espécies reativas durante eventos desmielinizantes. Possivelmente tal situação ocorra devido a grande quantidade de Na^+, K^+ -ATPase expressa e localizada nos nodos de Ranvier ao longo dos axônios. A desmielinização leva a morte de oligodendrócitos e a um grande dano axonal, o qual pode evoluir para uma degeneração deste axônio. Pelo fato dos axônios estarem mais expostos aos efeitos deletérios da desmielinização, a Na^+, K^+ -ATPase torna-se mais suscetível as espécies reativas geradas no processo desmielinizante (DOLAPCHIEVA; ICHEV; OVTSCHAROFF, 1989; ALBERTI et al., 2007).

Em contrapartida, um efeito distinto foi observado para a atividade da Na^+, K^+ -ATPase na neuroinflamação induzida pela exposição ao LPS no córtex cerebral e hipocampo. Neste segundo protocolo experimental, também foi verificado um aumento nos níveis de proteína carbonil, NOx e MDA em ambas as estruturas nos tempos de 4 e 24 horas pós administração de LPS. As propriedades antioxidantes das antocianinas mostraram um efeito mais pronunciado na maior dose, sendo 100 mg/kg a mais eficaz. No entanto, apesar da dose de 100 mg/kg prevenir o estresse oxidativo e nitrosativo, ela não foi capaz de impedir a redução na atividade da Na^+, K^+ -ATPase. No modelo de neuroinflamação aguda induzido por LPS parece não ter um envolvimento direto da ação de espécies reativas sobre a inibição da Na^+, K^+ -ATPase. Jeremias e colaboradores (2012) investigaram o efeito protetor de antioxidantes sobre a redução na atividade da Na^+, K^+ -ATPase num modelo de neuroinflamação induzida pela ligação do apêndice intestinal. A ligação do apêndice ocasiona sepse e encefalopatia. Neste estudo foi observado que a utilização de antioxidantes conseguiu prevenir a redução na atividade da Na^+, K^+ -ATPase somente no córtex cerebral. Nenhum efeito protetor foi visto para o hipocampo (JEREMIAS et al., 2012). Possivelmente os mecanismos que reduzem a atividade desta enzima em casos agudos de sepse não envolvem a ação direta de espécies reativas. Uma hipótese plausível seria o envolvimento de proteínas cinases e fosfatases que poderiam fosforilar/desfosforilar resíduos de aminoácidos presentes na estrutura da Na^+, K^+ -ATPase (MAHMMOUD; CORNELIUS, 2002; OLIVEIRA et al.,

2009; CORTES et al., 2011). Estas fosforilações/desfosforilações são capazes de reduzir ou aumentar a atividade da enzima conforme o alvo fosforilado. Para elucidar melhor este efeito, seria pertinente conduzir estudos com anticorpos específicos para as isoformas fosforiladas da Na^+, K^+ -ATPase com intuito de compreender com mais clareza o efeito da neuroinflamação aguda induzida pelo LPS sobre a atividade desta enzima (figura 9a).

Em relação aos marcadores inflamatórios analisados, a atividade da mieloperoxidase e os níveis de interleucinas mostraram um perfil inflamatório semelhante para ambos os modelos estudados. A desmielinização induzida pelo BE e a neuroinflamação induzida pelo LPS promoveram uma infiltração de neutrófilos na ponte e no hipocampo de roedores, respectivamente. Foi observado também uma elevação nos níveis de interleucina IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ e uma redução de IL-10 nos dois protocolos. As antocianinas foram capazes de prevenir a produção destes mediadores pró-inflamatórios e restabelecer os níveis de IL-10 perante a desmielinização. Em contrapartida, o efeito protetor das antocianinas sobre os níveis de IL encontrados na neuroinflamação induzida pelo LPS foi um pouco menor. As antocianinas mostraram uma prevenção parcial para os níveis de IL-1 β e IL-10. Apesar de diferenças significativas terem sido vistas para IL-6 e INF- γ , o efeito protetor das antocianinas foi muito pequeno e pouco representativo (figura 9b).

A redução da infiltração de células, principalmente neutrófilos (figura 9c), no local da lesão de desmielinização e a redução de citocinas pró-inflamatórias podem ter contribuído para a redução na morte de oligodendrócitos. Desta forma, as antocianinas foram capazes de prevenir a redução do conteúdo de mielina, confirmado pela coloração de *Luxol fast blue* (figura 9d).

Em relação ao protocolo de neuroinflamação, possivelmente um tratamento a longo prazo com antocianinas ou um aumento na dose poderia resultar em uma prevenção mais efetiva em relação ao aumento nos níveis de ILs. Embora tenha sido observado um efeito parcial sobre estes marcadores, as antocianinas foram capazes de restabelecer a temperatura corporal em níveis basais (reduzir o quadro de hipotermia) e prevenir a piora da memória encontrada nos animais expostos ao LPS. Estes achados fortalecem a hipótese de que as antocianinas podem ser eficazes também na prevenção da piora da memória encontrada em quadros de neuroinflamação aguda (figura 9e).

Tendo em vista que a desmielinização é um processo extremamente danoso aos axônios e estes fazem parte da estrutura de neurônios, foi avaliado neste estudo se a toxicidade do BE era exclusiva para células gliais e se a desmielinização poderia ter causado a morte de neurônios na ponte. Não foram encontradas evidências de alterações na viabilidade

dos neurônios na ponte pela coloração do violeta cresil. No entanto, foi notada uma alteração na morfologia destas células. Baseado nessas evidências, o BE não induziu a morte dos neurônios na ponte, mas sua toxicidade mediada por um processo inflamatório local poderia levar ao comprometimento na funcionalidade destes neurônios. Em paralelo, podemos sugerir que as antocianinas foram capazes de proteger estes neurônios das alterações morfológicas induzidas pelo BE.

Em relação ao modelo de LPS, foi possível observar uma fraca marcação na coloração de violeta de cresil, indicando que este modelo pode causar uma redução na viabilidade de neurônios, mas que deveriam ser confirmados através da imunohistoquímica para NeuN, um marcador clássico de neurônios. Nossos resultados demonstram uma imunoreatividade microglial, indicado pela marcação anti-CD11b. Um dos resultados mais promissores deste segundo protocolo foi que a dose de 100 mg/kg de antocianinas foi capaz de reduzir o aumento na marcação de CD11b nos animais expostos ao LPS (figura 9f). Estudos mostraram que a minociclina, um inibidor da micróglia, previne os efeitos da neuroinflamação induzida pela sepse em camundongos (MICHELS et al., 2015). Este estudo relata que a minociclina previne o estresse oxidativo tecidual, o aumento na produção de ILs e na permeabilidade da barreira hematoencefálica, (MICHELS et al., 2015). Pelo fato de a micróglia ser “o maestro” responsável pela “orquestra” dos processos neuroinflamatórios, este efeito das antocianinas em suprimir sua reatividade e também a produção de citocinas pro-inflamatórias denotam que estes fitonutrientes (antocianinas do mirtilo e da uva) podem ser considerados moléculas promissoras úteis para a neuroinflamação associada tanto aos processos desmielinizantes como demais patologias que acometem o SNC (figura 9).

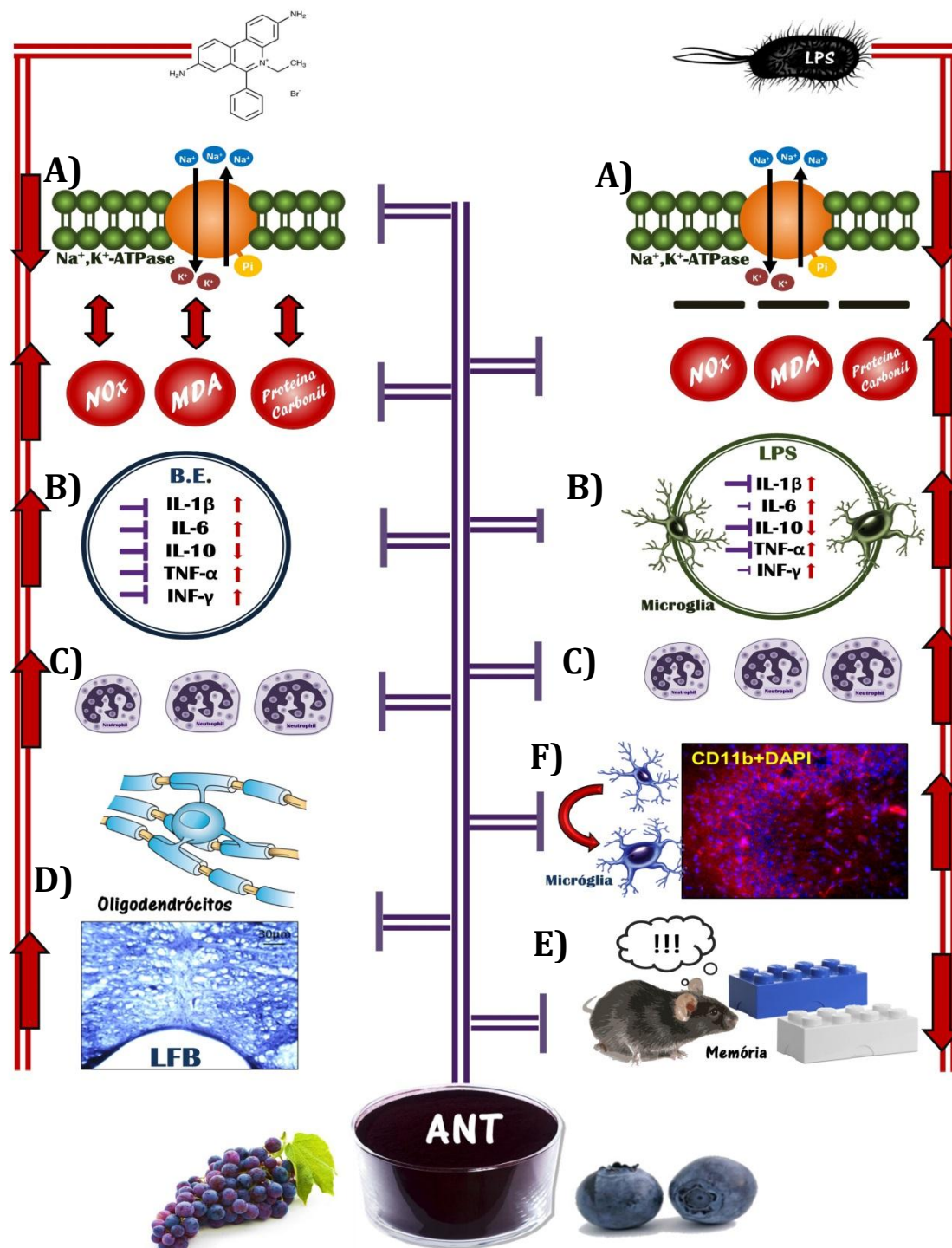


Figura 9 – Desmielinização e Neuroinflamação: Efeito protetor das antocianinas sobre os parâmetros comportamentais, morfológicos e bioquímicos analisados

Neste estudo, nossos resultados são pioneiros em definir um benéfico papel destes compostos em modelos que mimetizam eventos encontrados na EM. Em uma perspectiva futura, a fim de fortalecer a compreensão do papel das antocianinas na EM, intencionamos realizar estudos voltados a encefalomielite autoimune experimental (EAE). A EAE é

atualmente o padrão-ouro para estudos experimentais focados na EM uma vez que consiste na indução de uma autoimunidade nos roedores. Desta forma, o sistema imune destes animais passa a destruir a própria bainha de mielina. O evento se caracteriza pela inflamação tecidual na região lombar medular e consequente destruição de células de Schwann e representa um importante passo para desvendar o papel das antocianinas em estudos *in vivo* envolvendo a EM em animais.

5 CONCLUSÃO

5 CONCLUSÕES

- 1) Antocianinas foram capazes de neutralizar espécies reativas em modelos de indução de estresse oxidativo e nitrosativo *in vitro* reduzindo do conteúdo de malondialdeído, proteína carbonil e nitritos e nitrato na ponte de ratos.
- 2) Antocianinas suprimem a produção de mediadores pró-inflamatórios e de estresse oxidativo e nitrosativo induzidos pela desmielinização e neuroinflamação em roedores.
- 3) Antocianinas previnem alterações na morfologia de neurônios submetidos a neuroinflamação e a desmielinização experimental.
- 4) Antocianinas previnem a infiltração de neutrófilos no encéfalo de roedores submetidos a neuroinflamação e a desmielinização experimental.
- 5) Antocianinas protegem a redução na atividade da Na^+, K^+ -ATPase em ratos desmielinizados, porém não previne a redução na atividade desta enzima em animais submetidos a neuroinflamação pelo LPS.
- 6) Antocianinas protegem a desmielinização induzida pelo BE na ponte de ratos.
- 7) Antocianinas reduzem a imunoreatividade microglial induzida pelo LPS no hipocampo de camundongos.
- 8) Antocianinas previnem a piora da memória de camundongos submetidos a neuroinflamação experimental induzida por LPS.

Baseado nas conclusões acima, pode-se observar um papel neuroprotetor das antocianinas nos modelos experimentais estudados. Através destas evidências, as antocianinas podem atuar como importante agente terapêutico adjuvante contribuindo na prevenção ou proteção dos efeitos deletérios encontrados em doenças desmielinizantes e/ou neuroinflamatórias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, N. J. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. **Cell Mol Neurobiol**, v. 20, n. 2, p. 131-147, 2000.
- ABRAHAM, J.; JOHNSON, R. W. Central inhibition of interleukin-1beta ameliorates sickness behavior in aged mice. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 3, p. 396-401, 2009.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 7, p. 499-511, 2004.
- AKTAS, O.; ULLRICH, O.; INFANTE-DUARTE, C.; NITSCH, R.; ZIPP, F. Neuronal damage in brain inflammation. **Arch Neurol**, v. 64, n. 2, p. 185-189, 2007.
- ALBERTI, S.; GREGORIO, E. A.; SPADELLA, C. T.; COJOCEL, C. Localization and irregular distribution of Na,K-ATPase in myelin sheath from rat sciatic nerve. **Tissue Cell**, v. 39, n. 3, p. 195-201, 2007.
- ALI SHAH, S.; ULLAH, I.; LEE, H. Y.; KIM, M. O. Anthocyanins protect against ethanol-induced neuronal apoptosis via GABAB1 receptors intracellular signaling in prenatal rat hippocampal neurons. **Mol Neurobiol**, v. 48, n. 1, p. 257-269, 2013.
- ALLAN, S. M.; ROTHWELL, N. J. Cytokines and acute neurodegeneration. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 10, p. 734-744, 2001.
- ALLAN, S. M.; ROTHWELL, N. J. Inflammation in central nervous system injury. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 358, n. 1438, p. 1669-1677, 2003.
- ALVAREZ, J. I.; KATAYAMA, T.; PRAT, A. Glial influence on the blood brain barrier. **Glia**, v. 61, n. 12, p. 1939-1958, 2013.
- AMEDEI, A.; PRISCO, D.; D'ELIOS, M. M. Multiple sclerosis: the role of cytokines in pathogenesis and in therapies. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 10, p. 13438-13460, 2012.
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **FLAVONOIDS: Chemistry, Biochemistry and Applications**. . CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton (USA)., FL 33487-2742 p. 471-551, 2006.
- 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, n. 2, p. 111-120, 2005.

BAGCHI, D.; GARG, A.; KROHN, R. L.; BAGCHI, M.; BAGCHI, D. J.; BALMOORI, J.; STOHS, S. J. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. **Gen Pharmacol**, v. 30, n. 5, p. 771-776, 1998.

BARNES, D.; HUGHES, R. A.; MORRIS, R. W.; WADE-JONES, O.; BROWN, P.; BRITTON, T.; FRANCIS, D. A.; PERKIN, G. D.; RUDGE, P.; SWASH, M.; KATIFI, H.; FARMER, S.; FRANKEL, J. Randomised trial of oral and intravenous methylprednisolone in acute relapses of multiple sclerosis. **Lancet**, v. 349, n. 9056, p. 902-906, 1997.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. C.; PARADISO, M. A. Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. **ARTMED**, v. 3, n., p. 45-49, 2008.

BECKMANN, D. V.; CARVALHO, F. B.; MAZZANTI, C. M.; DOS SANTOS, R. P.; ANDRADES, A. O.; AIELLO, G.; RIPPILINGER, A.; GRACA, D. L.; ABDALLA, F. H.; OLIVEIRA, L. S.; GUTIERRES, J. M.; SCHETINGER, M. R.; MAZZANTI, A. Neuroprotective role of quercetin in locomotor activities and cholinergic neurotransmission in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. **Life Sci**, v. 103, n. 2, p. 79-87, 2014.

BEGGAH, A. T.; BEGUIN, P.; BAMBERG, K.; SACHS, G.; GEERING, K. beta-subunit assembly is essential for the correct packing and the stable membrane insertion of the H,K-ATPase alpha-subunit. **J Biol Chem**, v. 274, n. 12, p. 8217-8223, 1999.

BEGUIN, P.; WANG, X.; FIRSOV, D.; PUOTI, A.; CLAEYS, D.; HORISBERGER, J. D.; GEERING, K. The gamma subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. **Embo J**, v. 16, n. 14, p. 4250-4260, 1997.

BERER, K.; MUES, M.; KOUTROLOS, M.; RASBI, Z. A.; BOZIKI, M.; JOHNER, C.; WEKERLE, H.; KRISHNAMOORTHY, G. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. **Nature**, v. 479, n. 7374, p. 538-541, 2011.

BHUIYAN, M. I.; KIM, J. Y.; HA, T. J.; KIM, S. Y.; CHO, K. O. Anthocyanins extracted from black soybean seed coat protect primary cortical neurons against in vitro ischemia. **Biol Pharm Bull**, v. 35, n. 7, p. 999-1008, 2012.

BONDAN, E. F.; LALLO, M. A.; DAGLI, M. L.; SANCHEZ, M.; GRACA, D. L. [Investigation into the astrocytic immunoreactivity to GFAP and vimentin in the brainstem of Wistar rats submitted to the ethidium bromide gliotoxic model]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 61, n. 3A, p. 642-649, 2003.

BONDAN, E. F.; LALLO, M. A.; MARTINS MDE, F.; GRACA, D. L. Schwann cell expression of an oligodendrocyte-like remyelinating pattern after ethidium bromide injection in the rat spinal cord. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 68, n. 5, p. 783-787, 2010.

BONDAN, E. F.; LALLO, M. A.; ORSINI, H.; BENTUBO, H. L.; YAZBEK, A.; MACRINI, D. J.; BERNARDI, M. M.; GRACA, D. L. [Evaluation of locomotor activity after a local

induction of toxic demyelination in the brainstem of Wistar rats]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 64, n. 2B, p. 496-503, 2006b.

BONDAN, E. F.; LALLO, M. A.; SINHORINI, I. L.; PEREIRA, L. A.; GRACA, D. L. The effect of cyclophosphamide on brainstem remyelination following local ethidium bromide injection in Wistar rats. **J Submicrosc Cytol Pathol**, v. 32, n. 4, p. 603-612, 2000.

BONDAN, E. F.; LALLO, M. A.; TRIGUEIRO, A. H.; RIBEIRO, C. P.; SINHORINI, I. L.; GRACA, D. L. Delayed Schwann cell and oligodendrocyte remyelination after ethidium bromide injection in the brainstem of Wistar rats submitted to streptozotocin diabetogenic treatment. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 5, p. 637-646, 2006a.

BOSTOCK, H.; SEARS, T. A. The internodal axon membrane: electrical excitability and continuous conduction in segmental demyelination. **J Physiol**, v. 280, n.1, p. 273-301, 1978.

BOSTOCK, H.; SEARS, T. A.; SHERRATT, R. M. The spatial distribution of excitability and membrane current in normal and demyelinated mammalian nerve fibres. **J Physiol**, v. 341, n., p. 41-58, 1983.

CAMPOS-BEDOLLA, P.; WALTER, F. R.; VESZELKA, S.; DELI, M. A. Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system. **Arch Med Res**, v. 45, n. 8, p. 610-638, 2014.

CASTANEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNANDEZ, M. L.; PAEZ-HERNANDEZ, M. E.; RODRIGUES, J.; GALAN-VIDAL, C. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chem**, v. 113, n. 4, p. 859-871, 2009.

CHAUHAN, N. B.; LEE, J. M.; SIEGEL, G. J. Na,K-ATPase mRNA levels and plaque load in Alzheimer's disease. **J Mol Neurosci**, v. 9, n. 3, p. 151-166, 1997.

CHAUHAN, N. B.; MEHLA, J. Ameliorative Effects of Nutraceuticals in Neurological Disorders. Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease. In: **Drugs and Foods and Nutraceutical interactions during treatment**, v. 27, p. 245-260, 2015.

CHEN, X.; MA, X.; JIANG, Y.; PI, R.; LIU, Y.; MA, L. The prospects of minocycline in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, v. 235, n. 1-2, p. 1-8, 2011.

CHO, J.; KANG, J. S.; LONG, P. H.; JING, J.; BACK, Y.; CHUNG, K. S. Antioxidant and memory enhancing effects of purple sweet potato anthocyanin and cordyceps mushroom extract. **Arch Pharm Res**, v. 26, n. 10, p. 821-825, 2003.

CONFAVREUX, C.; VUKUSIC, S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. **Brain**, v. 129, n. 3, p. 606-616, 2006.

CORTES, V. F.; RIBEIRO, I. M.; BARRABIN, H.; ALVES-FERREIRA, M.; FONTES, C. F. Regulatory phosphorylation of FXD2 by PKC and cross interactions between FXD2,

plasmalemmal Ca-ATPase and Na,K-ATPase. **Arch Biochem Biophys**, v. 505, n. 1, p. 75-82, 2011.

COZZOLINO, S. Nutracêuticos: o que Significa? **Revista da Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica**, v. 55, n., p. 5-7, 2012.

DARVESH, A. S.; CARROLL, R. T.; BISHAYEE, A.; GELDENHUYS, W. J.; VAN DER SCHYF, C. J. Oxidative stress and Alzheimer's disease: dietary polyphenols as potential therapeutic agents. **Expert Rev Neurother**, v. 10, n. 5, p. 729-745, 2010.

DE LORES ARNAIZ, G. R.; ORDIERES, M. G. Brain Na(+), K(+)-ATPase Activity In Aging and Disease. **Int J Biomed Sci**, v. 10, n. 2, p. 85-102, 2014.

DEL RIO, D.; BORGES, G.; CROZIER, A. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. **Br J Nutr**, v. 104 Suppl 3, n., p. S67-90, 2010.

DENG, X.; LI, M.; AI, W.; HE, L.; LU, D.; PATRYLO, P. R.; CAI, H.; LUO, X.; LI, Z.; YAN, X. Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation Is Associated with Alzheimer-Like Amyloidogenic Axonal Pathology and Dendritic Degeneration in Rats. **Adv Alzheimer Dis**, v. 3, n. 2, p. 78-93, 2014.

DOLAPCHIEVA, S.; ICHEV, K.; OVTSCHAROFF, W. Cytochemical localization of ATPase in axon-myelin-Schwann cell complex type. **Z Mikrosk Anat Forsch**, v. 103, n. 1, p. 151-165, 1989.

DOS REIS, E. A.; DE OLIVEIRA, L. S.; LAMERS, M. L.; NETTO, C. A.; WYSE, A. T. Arginine administration inhibits hippocampal Na(+),K(+)-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. **Brain Res**, v. 951, n. 2, p. 151-157, 2002.

ELLWARDT, E.; ZIPP, F. Molecular mechanisms linking neuroinflammation and neurodegeneration in MS. **Exp Neurol**, v. 262, p. 8-17, 2014.

ESPIN, J. C.; GARCIA-CONESA, M. T.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Nutraceuticals: facts and fiction. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2986-3008, 2007.

FAN, L.; WANG, T.; CHANG, L.; SONG, Y.; WU, Y.; MA, D. Systemic inflammation induces a profound long term brain cell injury in rats. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v. 74, n. 3, p. 298-306, 2014.

FARIA, A.; MEIRELES, M.; FERNANDES, I.; SANTOS-BUELGA, C.; GONZALEZ-MANZANO, S.; DUENAS, M.; DE FREITAS, V.; MATEUS, N.; CALHAU, C. Flavonoid metabolites transport across a human BBB model. **Food Chem**, v. 149, n., p. 190-196, 2014.

FARIA, A.; PESTANA, D.; AZEVEDO, J.; MARTEL, F.; DE FREITAS, V.; AZEVEDO, I.; MATEUS, N.; CALHAU, C. Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells - Putative involvement of GLUT2. **Mol Nutr Food Res**, v. 53, n. 11, p. 1430-1437, 2009.

FARIA, A.; PESTANA, D.; TEIXEIRA, D.; COURAUD, P. O.; ROMERO, I.; WEKSLER, B.; DE FREITAS, V.; MATEUS, N.; CALHAU, C. Insights into the putative catechin and epicatechin transport across blood-brain barrier. **Food Funct**, v. 2, n. 1, p. 39-44, 2011.

FERRI, P.; ANGELINO, D.; GENNARI, L.; BENEDETTI, S.; AMBROGINI, P.; DEL GRANDE, P.; NINFALI, P. Enhancement of flavonoid ability to cross the blood-brain barrier of rats by co-administration with alpha-tocopherol. **Food Funct**, v. 6, n. 2, p. 394-400, 2015.

FINKELSZTEJN, A.; LOPES, J. S.; NOAL, J.; FINKELSZTEJN, J. M. The prevalence of multiple sclerosis in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 72, n. 2, p. 104-106, 2014.

FOX, N. C.; JENKINS, R.; LEARY, S. M.; STEVENSON, V. L.; LOSSEFF, N. A.; CRUM, W. R.; HARVEY, R. J.; ROSSOR, M. N.; MILLER, D. H.; THOMPSON, A. J. Progressive cerebral atrophy in MS: a serial study using registered, volumetric MRI. **Neurology**, v. 54, n. 4, p. 807-812, 2000.

FOX, R. J.; FISHER, E.; TKACH, J.; LEE, J. C.; COHEN, J. A.; RUDICK, R. A. Brain atrophy and magnetization transfer ratio following methylprednisolone in multiple sclerosis: short-term changes and long-term implications. **Mult Scler**, v. 11, n. 2, p. 140-145, 2005.

FRANCOIS, A.; TERRO, F.; QUELLARD, N.; FERNANDEZ, B.; CHASSAING, D.; JANET, T.; RIOUX BILAN, A.; PACCALIN, M.; PAGE, G. Impairment of autophagy in the central nervous system during lipopolysaccharide-induced inflammatory stress in mice. **Mol Brain**, v. 7, n., p. 56, 2014.

FRANK, T.; NETZEL, M.; STRASS, G.; BITSCH, R.; BITSCH, I. Bioavailability of anthocyanidin-3-glucosides following consumption of red wine and red grape juice. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 81, n. 5, p. 423-435, 2003.

FUJISAWA, H.; KAJIKAWA, K.; OHI, Y.; HASHIMOTO, Y.; YOSHIDA, H. Movement of radioactive calcium in brain slices and influences on it of protoveratrine, ouabain, potassium chloride and cocaine. **Jpn J Pharmacol**, v. 15, n. 4, p. 327-334, 1965.

GAMBUZZA, M.; LICATA, N.; PALELLA, E.; CELI, D.; FOTI CUZZOLA, V.; ITALIANO, D.; MARINO, S.; BRAMANTI, P. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics for multiple sclerosis management. **J Neuroimmunol**, v. 239, n. 1-2, p. 1-12, 2011.

GARAY, L.; GONZALEZ DENISELLE, M. C.; GIERMAN, L.; MEYER, M.; LIMA, A.; ROIG, P.; DE NICOLA, A. F. Steroid protection in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n. 1, p. 76-83, 2008.

GARRIDO-MESA, N.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. Minocycline: far beyond an antibiotic. **Br J Pharmacol**, v. 169, n. 2, p. 337-352, 2013.

- GOLDENBERG, M. M. Multiple sclerosis review. **P T**, v. 37, n. 3, p. 175-184, 2012.
- GRACA, D. L. [Research on demyelination induced by ethidium bromide in the central nervous system]. **Rev Paul Med**, v. 105, n. 4, p. 238, 1987.
- GRACA, D. L. [Toxic demyelination of the central nervous system. I. Effect of an intercalating gliotoxic drug on the spinal cord in Wistar rats]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 47, n. 3, p. 263-267, 1989a.
- GRACA, D. L. [Toxic demyelination of the central nervous system. II. Biological aspects of Schwann cells observed during the tissue repair process]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 47, n. 3, p. 268-273, 1989b.
- GRACA, D. L. The presence of lymphocytes in a toxically induced demyelinating process of the central nervous system. **Microsc Electron Biol Celular**, v. 12, n. 1, p. 17-21, 1988.
- GRACA, D. L.; BLAKEMORE, W. F. Delayed remyelination in rat spinal cord following ethidium bromide injection. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 12, n. 6, p. 593-605, 1986.
- GRACA, D. L.; BONDAN, E. F.; PEREIRA, L. A.; FERNANDES, C. G.; MAIORKA, P. C. Behaviour of oligodendrocytes and Schwann cells in an experimental model of toxic demyelination of the central nervous system. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 59, n. 2-B, p. 358-361, 2001.
- GRANGER, J. I.; RATTI, P. L.; DATTA, S. C.; RAYMOND, R. M.; OPP, M. R. Sepsis-induced morbidity in mice: effects on body temperature, body weight, cage activity, social behavior and cytokines in brain. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 7, p. 1047-1057, 2013.
- GUIMARAES, J.; SA, M. J. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. **Front Neurol**, v. 3, n., p. 74, 2012.
- GUPTA, C.; PRAKASH, D. Phytonutrients as therapeutic agents. **J Complement Integr Med**, v. 11, n. 3, p. 151-169, 2014.
- GUTIERRES, J. M.; CARVALHO, F. B.; SCHETINGER, M. R.; AGOSTINHO, P.; MARISCO, P. C.; VIEIRA, J. M.; ROSA, M. M.; BOHNERT, C.; RUBIN, M. A.; MORSCH, V. M.; SPANEVELLO, R.; MAZZANTI, C. M. Neuroprotective effect of anthocyanins on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia in rats. **Int J Dev Neurosci**, v. 33, n., p. 88-97, 2014a.
- GUTIERRES, J. M.; CARVALHO, F. B.; SCHETINGER, M. R.; MARISCO, P.; AGOSTINHO, P.; RODRIGUES, M.; RUBIN, M. A.; SCHMATZ, R.; DA SILVA, C. R.; DE, P. C. G.; FARIAS, J. G.; SIGNOR, C.; MORSCH, V. M.; MAZZANTI, C. M.; BOGO, M.; BONAN, C. D.; SPANEVELLO, R. Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. **Life Sci**, v. 96, n. 1-2, p. 7-17, 2014b.

GUTIERRES, J. M.; CARVALHO, F. B.; SCHETINGER, M. R.; RODRIGUES, M. V.; SCHMATZ, R.; PIMENTEL, V. C.; VIEIRA, J. M.; ROSA, M. M.; MARISCO, P.; RIBEIRO, D. A.; LEAL, C.; RUBIN, M. A.; MAZZANTI, C. M.; SPANEVELLO, R. Protective effects of anthocyanins on the ectonucleotidase activity in the impairment of memory induced by scopolamine in adult rats. **Life Sci**, v. 91, n. 23-24, p. 1221-1228, 2012.

HABECK, M.; HAVIV, H.; KATZ, A.; KAPRI-PARDES, E.; AYCIRIEX, S.; SHEVCHENKO, A.; OGAWA, H.; TOYOSHIMA, C.; KARLISH, S. J. Stimulation, inhibition, or stabilization of Na,K-ATPase caused by specific lipid interactions at distinct sites. **J Biol Chem**, v. 290, n. 8, p. 4829-4842, 2015.

HAINSWORTH, A. H.; OOMMEN, A. T.; BRIDGES, L. R. Endothelial cells and human cerebral small vessel disease. **Brain Pathol**, v. 25, n. 1, p. 44-50, 2015.

HARDY, G. Nutraceutical and functional Foods: Introduction and meaning. **Nutrition**, v. 16, n. 7, p. 688-689, 2000.

HAUSS-WEGRZYNIAK, B.; DOBRZANSKI, P.; STOEHR, J. D.; WENK, G. L. Chronic neuroinflammation in rats reproduces components of the neurobiology of Alzheimer's disease. **Brain Res**, v. 780, n. 2, p. 294-303, 1998.

HENRY, C. J.; HUANG, Y.; WYNNE, A.; HANKE, M.; HIMLER, J.; BAILEY, M. T.; SHERIDAN, J. F.; GODBOUT, J. P. Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. **J Neuroinflammation**, v. 5, n. 15, p. 15, 2008.

HERBER, D. L.; MERCER, M.; ROTH, L. M.; SYMMONDS, K.; MALONEY, J.; WILSON, N.; FREEMAN, M. J.; MORGAN, D.; GORDON, M. N. Microglial activation is required for Abeta clearance after intracranial injection of lipopolysaccharide in APP transgenic mice. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 2, n. 2, p. 222-231, 2007.

HERNANDEZ-ROMERO, M. C.; DELGADO-CORTES, M. J.; SARMIENTO, M.; DE PABLOS, R. M.; ESPINOSA-OLIVA, A. M.; ARGUELLES, S.; BANDEZ, M. J.; VILLARAN, R. F.; MAURINO, R.; SANTIAGO, M.; VENERO, J. L.; HERRERA, A. J.; CANO, J.; MACHADO, A. Peripheral inflammation increases the deleterious effect of CNS inflammation on the nigrostriatal dopaminergic system. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 3, p. 347-360, 2012.

HOLLMAN, P. C.; BIJSMAN, M. N.; VAN GAMEREN, Y.; CNOSSEN, E. P.; DE VRIES, J. H.; KATAN, M. B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. **Free Radic Res**, v. 31, n. 6, p. 569-573, 1999.

HORISBERGER, J. D. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. **Physiology (Bethesda)**, v. 19, n. 6, p. 377-387, 2004.

ICHIYANAGI, T.; RAHMAN, M. M.; KASHIWADA, Y.; IKESHIRO, Y.; SHIDA, Y.; HATANO, Y.; MATSUMOTO, H.; HIRAYAMA, M.; TSUDA, T.; KONISHI, T. Absorption

and metabolism of delphinidin 3-O-beta-D-glucopyranoside in rats. **Free Radic Biol Med**, v. 36, n. 7, p. 930-937, 2004.

JAEGER, L. B.; DOHGU, S.; SULTANA, R.; LYNCH, J. L.; OWEN, J. B.; ERICKSON, M. A.; SHAH, G. N.; PRICE, T. O.; FLEEGAL-DEMOTTA, M. A.; BUTTERFIELD, D. A.; BANKS, W. A. Lipopolysaccharide alters the blood-brain barrier transport of amyloid beta protein: a mechanism for inflammation in the progression of Alzheimer's disease. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 4, p. 507-517, 2009.

JEREMIAS, I. C.; SCAINI, G.; CONSTANTINO, L.; VUOLO, F.; FERREIRA, A. K.; SCHERER, E. B.; KOLLING, J.; DA SILVA DORNELLES, A.; DE SOUZA WYSE, A. T.; BOGO, M. R.; DAL-PIZZOL, F.; STRECK, E. L. The decrease on Na(+), K(+)-ATPase activity in the cortex, but not in hippocampus, is reverted by antioxidants in an animal model of sepsis. **Mol Neurobiol**, v. 46, n. 2, p. 467-474, 2012.

JORGENSEN, P. L.; HAKANSSON, K. O.; KARLISH, S. J. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. **Annu Rev Physiol**, v. 65, n. 1, p. 817-849, 2003.

KALRA, E. K. Nutraceutical--definition and introduction. **AAPS PharmSci**, v. 5, n. 3, p. E25, 2003.

KALT, W.; BLUMBERG, J. B.; MCDONALD, J. E.; VINQVIST-TYMCHUK, M. R.; FILLMORE, S. A.; GRAF, B. A.; O'LEARY, J. M.; MILBURY, P. E. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 3, p. 705-712, 2008.

KAMM, C. P.; UITDEHAAG, B. M.; POLMAN, C. H. Multiple sclerosis: current knowledge and future outlook. **Eur Neurol**, v. 72, n. 3-4, p. 132-141, 2014.

KANG, T. H.; HUR, J. Y.; KIM, H. B.; RYU, J. H.; KIM, S. Y. Neuroprotective effects of the cyanidin-3-O-beta-d-glucopyranoside isolated from mulberry fruit against cerebral ischemia. **Neurosci Lett**, v. 391, n. 3, p. 122-126, 2006.

KAPLAN, J. H. Biochemistry of Na,K-ATPase. **Annu Rev Biochem**, v. 71, n. 1, p. 511-535, 2002.

KIM, H. G.; JU, M. S.; SHIM, J. S.; KIM, M. C.; LEE, S. H.; HUH, Y.; KIM, S. Y.; OH, M. S. Mulberry fruit protects dopaminergic neurons in toxin-induced Parkinson's disease models. **Br J Nutr**, v. 104, n. 1, p. 8-16, 2010.

KIPP, M.; VAN DER VALK, P.; AMOR, A. Pathology of Multiple Sclerosis. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 11, n. 5, p. 506-517, 2012.

KONG, J. M.; CHIA, L. S.; GOH, N. K.; CHIA, T. F.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 923-933, 2003.

KOZLOWSKA, A.; SZOSTAK-WEGIEREK, D. Flavonoids--food sources and health benefits. **Rocz Panstw Zakl Hig**, v. 65, n. 2, p. 79-85, 2014.

KURNELLAS, M. P.; NICOT, A.; SHULL, G. E.; ELKABES, S. Plasma membrane calcium ATPase deficiency causes neuronal pathology in the spinal cord: a potential mechanism for neurodegeneration in multiple sclerosis and spinal cord injury. **FASEB J**, v. 19, n. 2, p. 298-300, 2005.

KURSCHUS, F. C.; WORTGE, S.; WAISMAN, A. Modeling a complex disease: multiple sclerosis. **Adv Immunol**, v. 110, p. 111-137, 2011.

LASEKAN, O. Exotic berries as a functional food. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 17, n. 6, p. 589-595, 2014.

LASSMANN, H. Multiple sclerosis: Lessons from molecular neuropathology. **Exp Neurol**, v. 262PA, n., p. 2-7, 2014.

LAZZARINI, R.; GRIFFIN, J. W.; LASSMAN, H.; KLAUS-ARMIN; NAVE, K.; MILLER, R.; TRAPP, B. D. **Myelin Biology and Disorders**. Estados Unidos: Elsevier Academic Press, v. 1, p.116-120, 2004.

LEE, J. W.; LEE, Y. K.; YUK, D. Y.; CHOI, D. Y.; BAN, S. B.; OH, K. W.; HONG, J. T. Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. **J Neuroinflammation**, v. 5, n. 1, p. 37, 2008.

LEE, S. G.; KIM, B.; YANG, Y.; PHAM, T. X.; PARK, Y. K.; MANATOU, J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K.; LEE, J. Y. Berry anthocyanins suppress the expression and secretion of proinflammatory mediators in macrophages by inhibiting nuclear translocation of NF-kappaB independent of NRF2-mediated mechanism. **J Nutr Biochem**, v. 25, n. 4, p. 404-411, 2014.

LINGREL, J. B.; KUNTZWEILER, T. Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. **J Biol Chem**, v. 269, n. 31, p. 19659-19662, 1994.

LINGREL, J. B.; VAN HUYSSSE, J.; O'BRIEN, W.; JEWELL-MOTZ, E.; ASKEW, R.; SCHULTHEIS, P. Structure-function studies of the Na,K-ATPase. **Kidney Int Suppl**, v. 44, p. 32-39, 1994.

LITTLE, A. R.; O'CALLAGHA, J. P. Astrogliosis in the adult and developing CNS: is there a role for proinflammatory cytokines? **Neurotoxicology**, v. 22, n. 5, p. 607-618, 2001.

LU, Y. C.; YEH, W. C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145-151, 2008.

LUCCHINETTI, C. F.; POPESCU, B. F.; BUNYAN, R. F.; MOLL, N. M.; ROEMER, S. F.; LASSMANN, H.; BRUCK, W.; PARISI, J. E.; SCHEITHAUER, B. W.; GIANNINI, C.; WEIGAND, S. D.; MANDREKAR, J.; RANSOHOFF, R. M. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. **N Engl J Med**, v. 365, n. 23, p. 2188-2197, 2011.

MACREADY, A. L.; BUTLER, L. T.; KENNEDY, O. B.; ELLIS, J. A.; WILLIAMS, C. M.; SPENCER, J. P. Cognitive tests used in chronic adult human randomised controlled trial micronutrient and phytochemical intervention studies. **Nutr Res Rev**, v. 23, n. 2, p. 200-229, 2010.

MACREADY, A. L.; GEORGE, T. W.; CHONG, M. F.; ALIMBETOV, D. S.; JIN, Y.; VIDAL, A.; SPENCER, J. P.; KENNEDY, O. B.; TUOHY, K. M.; MINIHANE, A. M.; GORDON, M. H.; LOVEGROVE, J. A. Flavonoid-rich fruit and vegetables improve microvascular reactivity and inflammatory status in men at risk of cardiovascular disease-FLAVURS: a randomized controlled trial. **Am J Clin Nutr**, v. 99, n. 3, p. 479-489, 2014.

MAHMMOUD, Y. A.; CORNELIUS, F. Protein kinase C phosphorylation of purified Na,K-ATPase: C-terminal phosphorylation sites at the alpha- and gamma-subunits close to the inner face of the plasma membrane. **Biophys J**, v. 82, n. 4, p. 1907-1919, 2002.

MARTA, M. Toll-like receptors in multiple sclerosis mouse experimental models. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1173, n. 1, p. 458-462, 2009.

MAZZA, G.; KAY, C. D.; COTTRELL, T.; HOLUB, B. J. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 26, p. 7731-7737, 2002.

MAZZANTI, C. M.; SPANEVELLO, R. M.; MORSCH, A.; ZANIN, R.; BATTISTI, V.; AHMED, M.; GONCALVES, J. F.; MAZZANTI, A.; GRACA, D. L.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. Previous treatment with ebselen and vitamin E alters adenine nucleotide hydrolysis in platelets from adult rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. **Life Sci**, v. 81, n. 3, p. 241-248, 2007a.

MAZZANTI, C. M.; SPANEVELLO, R. M.; PEREIRA, L. B.; GONCALVES, J. F.; KAIZER, R.; CORREA, M.; AHMED, M.; MAZZANTI, A.; FESTUGATTO, R.; GRACA, D. L.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. Acetylcholinesterase activity in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon beta. **Neurochem Res**, v. 31, n. 8, p. 1027-1034, 2006.

MAZZANTI, C. M.; SPANEVELLO, R.; AHMED, M.; PEREIRA, L. B.; GONCALVES, J. F.; CORREA, M.; SCHMATZ, R.; STEFANELLO, N.; LEAL, D. B.; MAZZANTI, A.; RAMOS, A. T.; MARTINS, T. B.; DANESI, C. C.; GRACA, D. L.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. Pre-treatment with ebselen and vitamin E modulate acetylcholinesterase activity: interaction with demyelinating agents. **Int J Dev Neurosci**, v. 27, n. 1, p. 73-80, 2009.

MAZZANTI, C. M.; SPANEVELLO, R.; AHMED, M.; SCHMATZ, R.; MAZZANTI, A.; SALBEGO, F. Z.; GRACA, D. L.; SALLIS, E. S.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. Cyclosporine A inhibits acetylcholinesterase activity in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. **Int J Dev Neurosci**, v. 25, n. 4, p. 259-264, 2007b.

MCGHIE, T. K.; WALTON, M. C. The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. **Mol Nutr Food Res**, v. 51, n. 6, p. 702-713, 2007.

MELLO, B. S.; MONTE, A. S.; MCINTYRE, R. S.; SOCZYNSKA, J. K.; CUSTODIO, C. S.; CORDEIRO, R. C.; CHAVES, J. H.; VASCONCELOS, S. M.; NOBRE, H. V., JR.; FLORENCO DE SOUSA, F. C.; HYPHANTIS, T. N.; CARVALHO, A. F.; MACEDO, D. S. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. **J Psychiatr Res**, v. 47, n. 10, p. 1521-1529, 2013.

MENDES, M. F.; TILBERY, H. P.; BALSIMELL, S.; FELIPE, E.; MOREIRA, M. A.; BARAO-CRUZ, A. M. [Fatigue in multiple sclerosis relapsing-remitting form]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 58, n. 2B, p. 471-475, 2000.

MICHELS, M.; VIEIRA, A. S.; VUOLO, F.; ZAPELINI, H. G.; MENDONCA, B.; MINA, F.; DOMINGUINI, D.; STECKERT, A.; SCHUCK, P. F.; QUEVEDO, J.; PETRONILHO, F.; DAL-PIZZOL, F. The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment. **Brain Behav Immun**, v. 43, p. 54-59, 2015.

MIKLOSSY, J. Chronic inflammation and amyloidogenesis in Alzheimer's disease -- role of Spirochetes. **J Alzheimers Dis**, v. 13, n. 4, p. 381-391, 2008.

MILBURY, P. E.; CAO, G.; PRIOR, R. L.; BLUMBERG, J. Bioavailability of elderberry anthocyanins. **Mech Ageing Dev**, v. 123, n. 8, p. 997-1006, 2002.

MILLAR, J. H.; VAS, C. J.; NORONHA, M. J.; LIVERSEDGE, L. A.; RAWSON, M. D. Long-term treatment of multiple sclerosis with corticotrophin. **Lancet**, v. 2, n. 7513, p. 429-431, 1967.

MIN, J.; YU, S. W.; BAEK, S. H.; NAIR, K. M.; BAE, O. N.; BHATT, A.; KASSAB, M.; NAIR, M. G.; MAJID, A. Neuroprotective effect of cyanidin-3-O-glucoside anthocyanin in mice with focal cerebral ischemia. **Neurosci Lett**, v. 500, n. 3, p. 157-161, 2011.

MINA, F.; COMIM, C. M.; DOMINGUINI, D.; CASSOL-JR, O. J.; DALL IGNA, D. M.; FERREIRA, G. K.; SILVA, M. C.; GALANT, L. S.; STRECK, E. L.; QUEVEDO, J.; DAL-PIZZOL, F. Il1-beta involvement in cognitive impairment after sepsis. **Mol Neurobiol**, v. 49, n. 2, p. 1069-1076, 2014.

MINGUETTI, G. [Magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: analysis of 270 cases]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 59, n. 3-A, p. 563-569, 2001.

MIRANDA-HERNANDEZ, S.; BAXTER, A. G. Role of toll-like receptors in multiple sclerosis. **Am J Clin Exp Immunol**, v. 2, n. 1, p. 75-93, 2013.

MIYAZAWA, T.; NAKAGAWA, K.; KUDO, M.; MURAISHI, K.; SOMEYA, K. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. **J Agric Food Chem**, v. 47, n. 3, p. 1083-1091, 1999.

MORAZZONI, P.; LIVIO, S.; SCILINGO, A.; MALANDRINO, S. Vaccinium myrtillus anthocyanosides pharmacokinetics in rats. **Arzneimittelforschung**, v. 41, n. 2, p. 128-131, 1991.

MOREIRA, M. A.; FELIPE, E.; MENDES, M. F.; TILBERY, C. P. [Multiple sclerosis: descriptive study of its clinical forms in 302 cases]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 58, n. 2B, p. 460-466, 2000.

MOSELEY, A. E.; WILLIAMS, M. T.; SCHAEFER, T. L.; BOHANAN, C. S.; NEUMANN, J. C.; BEHBEHANI, M. M.; VORHEES, C. V.; LINGREL, J. B. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. **J Neurosci**, v. 27, n. 3, p. 616-626, 2007.

NEUHAUS, O.; ARCHELOS, J. J.; HARTUNG, H. P. Immunomodulation in multiple sclerosis: from immunosuppression to neuroprotection. **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, n. 3, p. 131-138, 2003.

NGUYEN, M. D.; JULIEN, J. P.; RIVEST, S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n. 3, p. 216-227, 2002.

NIELSEN, I. L.; DRAGSTED, L. O.; RAVN-HAREN, G.; FREESE, R.; RASMUSSEN, S. E. Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. **J Agric Food Chem**, v. 51, n. 9, p. 2813-2820, 2003.

NISHI, A.; FISONE, G.; SNYDER, G. L.; DULUBOVA, I.; APERIA, A.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P. Regulation of Na⁺, K⁺-ATPase isoforms in rat neostriatum by dopamine and protein kinase C. **J Neurochem**, v. 73, n. 4, p. 1492-1501, 1999b.

NISHI, A.; SNYDER, G. L.; FIENBERG, A. A.; FISONE, G.; APERIA, A.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P. Requirement for DARPP-32 in mediating effect of dopamine D2 receptor activation. **Eur J Neurosci**, v. 11, n. 7, p. 2589-2592, 1999a.

OLIVEIRA, M. S.; FURIAN, A. F.; RAMBO, L. M.; RIBEIRO, L. R.; ROYES, L. F.; FERREIRA, J.; CALIXTO, J. B.; OTALORA, L. F.; GARRIDO-SANABRIA, E. R.; MELLO, C. F. Prostaglandin E2 modulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. **J Neurochem**, v. 109, n. 2, p. 416-426, 2009.

PASSAMONTI, S.; VRHOVSEK, U.; MATTIVI, F. The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 296, n. 3, p. 631-636, 2002.

PASSAMONTI, S.; VRHOVSEK, U.; VANZO, A.; MATTIVI, F. Fast access of some grape pigments to the brain. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 18, p. 7029-7034, 2005.

PASSAMONTI, S.; VRHOVSEK, U.; VANZO, A.; MATTIVI, F. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. **FEBS Lett**, v. 544, n. 1-3, p. 210-213, 2003.

PEREIRA, J. A.; LEBRUN-JULIEN, F.; SUTER, U. Molecular mechanisms regulating myelination in the peripheral nervous system. **Trends Neurosci**, v. 35, n. 2, p. 123-134, 2012.

PERRY, V. H. Contribution of systemic inflammation to chronic neurodegeneration. **Acta Neuropathol**, v. 120, n. 3, p. 277-286, 2010.

PERRY, V. H.; TEELING, J. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. **Semin Immunopathol**, v. 35, n. 5, p. 601-612, 2013.

POLIAK, S.; PELES, E. The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 12, p. 968-980, 2003.

POULOSE, S. M.; FISHER, D. R.; LARSON, J.; BIELINSKI, D. F.; RIMANDO, A. M.; CAREY, A. N.; SCHAUSS, A. G.; SHUKITT-HALE, B. Anthocyanin-rich acai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. **J Agric Food Chem**, v. 60, n. 4, p. 1084-1093, 2012.

PUGLIATTI, M.; ROSATI, G.; CARTON, H.; RIISE, T.; DRULOVIC, J.; VECSEI, L.; MILANOV, I. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. **Eur J Neurol**, v. 13, n. 7, p. 700-722, 2006.

QIN, L.; ZHANG, J.; QIN, M. Protective effect of cyanidin 3-O-glucoside on beta-amyloid peptide-induced cognitive impairment in rats. **Neurosci Lett**, v. 534, p. 285-288, 2013.

QUAN, N.; HERKENHAM, M. Connecting cytokines and brain: a review of current issues. **Histol Histopathol**, v. 17, n. 1, p. 273-288, 2002.

RAMIREZ, M. R.; IZQUIERDO, I.; DO CARMO BASSOLS RASEIRA, M.; ZUANAZZI, J. A.; BARROS, D.; HENRIQUES, A. T. Effect of lyophilised *Vaccinium* berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats. **Pharmacol Res**, v. 52, n. 6, p. 457-462, 2005.

RAMSEY, C. P.; TANSEY, M. G. A survey from 2012 of evidence for the role of neuroinflammation in neurotoxin animal models of Parkinson's disease and potential molecular targets. **Exp Neurol**, v. 256, p. 126-132, 2014.

RENDEIRO, C.; GUERREIRO, J. D.; WILLIAMS, C. M.; SPENCER, J. P. Flavonoids as modulators of memory and learning: molecular interactions resulting in behavioural effects. **Proc Nutr Soc**, v. 71, n. 2, p. 246-262, 2012.

RODRIGUEZ-MATEOS, A.; RENDEIRO, C.; BERGILLOS-MECA, T.; TABATABAEE, S.; GEORGE, T. W.; HEISS, C.; SPENCER, J. P. Intake and time dependence of blueberry flavonoid-induced improvements in vascular function: a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study with mechanistic insights into biological activity. **Am J Clin Nutr**, v. 98, n. 5, p. 1179-1191, 2013.

ROSENDAL, F.; BJARKAM, C. R.; LARSEN, M.; HANSEN, H. E.; MADSEN, M.; SORENSEN, J. C.; MORTENSEN, J. Does chronic low-dose treatment with cyclosporine influence the brain? A histopathological study in pigs. **Transplant Proc**, v. 37, n. 8, p. 3305-3308, 2005.

RUIZ-PENA, J. L.; IZQUIERDO-AYUSO, G. [Immunosuppressants and multiple sclerosis]. **Rev Neurol**, v. 35, n. 4, p. 373-380, 2002.

RUSAK, G.; GUTZEIL, H.; MÜLLER, J. Structurally related flavonoids with antioxidative properties differentially affect cell cycle progression and apoptosis of human acute leukemia cells. **Nutr Res**, v. 25, n. 2, p. 143-155, 2005.

SANCHEZ, M.; BONDAN, E. F.; LALLO, M. A.; SINHORINI, I. L.; DAGLI, M. L.; MAIORKA, P. C.; PEREIRA, L. A.; GRACA, D. L. [Immunohistochemical staining of the macrophagic and astrocytic response in the brainstem of Wistar rats submitted to the ethidium bromide gliotoxic model and treated with cyclophosphamide]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 64, n. 3B, p. 787-793, 2006.

SANTOS-BUELGA, C.; MATEUS, N.; DE FREITAS, V. Anthocyanins. Plant pigments and beyond. **J Agric Food Chem**, v. 62, n. 29, p. 6879-6884, 2014.

SCHLUEP, M.; BOGOUSLAVSKY, J. Emerging treatments in multiple sclerosis. **Eur Neurol**, v. 38, n. 3, p. 216-221, 1997.

SCHWALM, M. T.; PASQUALI, M.; MIGUEL, S. P.; DOS SANTOS, J. P.; VUOLO, F.; COMIM, C. M.; PETRONILHO, F.; QUEVEDO, J.; GELAIN, D. P.; MOREIRA, J. C.; RITTER, C.; DAL-PIZZOL, F. Acute brain inflammation and oxidative damage are related to long-term cognitive deficits and markers of neurodegeneration in sepsis-survivor rats. **Mol Neurobiol**, v. 49, n. 1, p. 380-385, 2014.

SELLEBJERG, F.; FREDERIKSEN, J. L.; NIELSEN, P. M.; OLESEN, J. Double-blind, randomized, placebo-controlled study of oral, high-dose methylprednisolone in attacks of MS. **Neurology**, v. 51, n. 2, p. 529-534, 1998.

SHAH, S. A.; YOON, G. H.; KIM, M. O. Protection of the Developing Brain with Anthocyanins Against Ethanol-Induced Oxidative Stress and Neurodegeneration. **Mol Neurobiol**, v., n., p., 2014.

SHARRACK, B.; HUGHES, R. A.; MORRIS, R. W.; SOUDAIN, S.; WADE-JONES, O.; BARNES, D.; BROWN, P.; BRITTON, T.; FRANCIS, D. A.; PERKIN, G. D.; RUDGE, P.; SWASH, M.; KATIFI, H. A.; FARMER, S.; FRANKEL, J. P. The effect of oral and intravenous methylprednisolone treatment on subsequent relapse rate in multiple sclerosis. **J Neurol Sci**, v. 173, n. 1, p. 73-77, 2000.

SHENG, J. G.; BORA, S. H.; XU, G.; BORCHELT, D. R.; PRICE, D. L.; KOLIATSOS, V. E. Lipopolysaccharide-induced-neuroinflammation increases intracellular accumulation of

amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in APPswe transgenic mice. **Neurobiol Dis**, v. 14, n. 1, p. 133-145, 2003.

SHIH, P. H.; CHAN, Y. C.; LIAO, J. W.; WANG, M. F.; YEN, G. C. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. **J Nutr Biochem**, v. 21, n. 7, p. 598-605, 2010.

SHIN, W. H.; PARK, S. J.; KIM, E. J. Protective effect of anthocyanins in middle cerebral artery occlusion and reperfusion model of cerebral ischemia in rats. **Life Sci**, v. 79, n. 2, p. 130-137, 2006.

SHU, X.; LI, Y.; YAN, W.; ZHOU, Y. [Anti-oxidative effects of proanthocyanidins in mice induced by D-galactose]. **Wei Sheng Yan Jiu**, v. 31, n. 3, p. 191-192, 196, 2002.

SIFFRIN, V.; VOGT, J.; RADBRUCH, H.; NITSCH, R.; ZIPP, F. Multiple sclerosis - candidate mechanisms underlying CNS atrophy. **Trends Neurosci**, v. 33, n. 4, p. 202-210, 2010.

SKEMIENE, K.; LIOBIKAS, J.; BORUTAITE, V. Anthocyanins as substrates for mitochondrial complex I - protective effect against heart ischemic injury. **FEBS J**, v. 282, n. 5, p. 963-971, 2015.

SKEMIENE, K.; RAKAUSKAITE, G.; TRUMBECKAITE, S.; LIOBIKAS, J.; BROWN, G. C.; BORUTAITE, V. Anthocyanins block ischemia-induced apoptosis in the perfused heart and support mitochondrial respiration potentially by reducing cytosolic cytochrome c. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 45, n. 1, p. 23-29, 2013.

SKENDER-GAZIBARA, M.; CVETKOVIC-DOZIC, D.; JOVANVIC, V.; DOZIC, S. Etiopathogenesis of multiple sclerosis. **Archive of Oncology**, v., n. 9, p. 8-10, 2001.

SKOU, J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. **Biochim Biophys Acta**, v. 23, n. 2, p. 394-401, 1957.

SKOU, J. C.; ESMANN, M. The Na,K-ATPase. **J Bioenerg Biomembr**, v. 24, n. 3, p. 249-261, 1992.

SMITH, P. M.; FRANKLIN, R. J. The effect of immunosuppressive protocols on spontaneous CNS remyelination following toxin-induced demyelination. **J Neuroimmunol**, v. 119, n. 2, p. 261-268, 2001.

SPANEVELLO, R. M.; MAZZANTI, C. M.; MALDONADO, P. A.; ZANIN, R.; MORSCH, A.; HANNEL, L.; MAZZANTI, A.; FESTUGATTO, R.; GRACA, D.; SCHMATZ, R.; LORO, V. L.; SCHETINGER, M. R.; MORSCH, V. M. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon-beta. **Life Sci**, v. 80, n. 12, p. 1109-1114, 2007.

SPENCER, J. P. Food for thought: the role of dietary flavonoids in enhancing human memory, learning and neuro-cognitive performance. **Proc Nutr Soc**, v. 67, n. 2, p. 238-252, 2008.

SPENCER, J. P.; VAFEIADOU, K.; WILLIAMS, R. J.; VAUZOUR, D. Neuroinflammation: modulation by flavonoids and mechanisms of action. **Mol Aspects Med**, v. 33, n. 1, p. 83-97, 2012.

SPENCER, J. P.; VAUZOUR, D.; RENDEIRO, C. Flavonoids and cognition: the molecular mechanisms underlying their behavioural effects. **Arch Biochem Biophys**, v. 492, n. 1-2, p. 1-9, 2009.

SRINIVASAN, M.; LAHIRI, D. K. Significance of NF-kappaB as a pivotal therapeutic target in the neurodegenerative pathologies of Alzheimer's disease and multiple sclerosis. **Expert Opin Ther Targets**, v. 19, n. 4, p. 471-487, 2015.

SRIRAM, S. Role of glial cells in innate immunity and their role in CNS demyelination. **J Neuroimmunol**, v. 239, n. 1-2, p. 13-20, 2011.

STEINMAN, L.; ZAMVIL, S. Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 6, p. 483-492, 2003.

STELMASHOOK, E. V.; WEIH, M.; ZOROV, D.; VICTOROV, I.; DIRNAGL, U.; ISAEV, N. Short-term block of Na⁺/K⁺-ATPase in neuro-glial cell cultures of cerebellum induces glutamate dependent damage of granule cells. **FEBS Lett**, v. 456, n. 1, p. 41-44, 1999.

STETTNER, M.; WOLFFRAM, K.; MAUSBERG, A. K.; ALBRECHT, P.; DERKSEN, A.; METHNER, A.; DEHMEL, T.; HARTUNG, H. P.; DIETRICH, H.; KIESEIER, B. C. Promoting myelination in an in vitro mouse model of the peripheral nerve system: the effect of wine ingredients. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66079, 2013.

STRATHEARN, K. E.; YOUSEF, G. G.; GRACE, M. H.; ROY, S. L.; TAMBE, M. A.; FERRUZZI, M. G.; WU, Q. L.; SIMON, J. E.; LILA, M. A.; ROCHET, J. C. Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinsons disease. **Brain Res**, v. 1555, p. 60-77, 2014.

STRAZIELLE, N.; GHERSI-EGEA, J. F. Efflux transporters in blood-brain interfaces of the developing brain. **Front Neurosci**, v. 9, p. 21, 2015.

TAKAHASHI, S.; SHIBATA, M.; GOTOH, J.; FUKUUCHI, Y. Astroglial cell death induced by excessive influx of sodium ions. **Eur J Pharmacol**, v. 408, n. 2, p. 127-135, 2000.

TAKASHIMA, H.; SMITH, D. R.; FUKAURA, H.; KHOURY, S. J.; HAFLE, D. A.; WEINER, H. L. Pulse cyclophosphamide plus methylprednisolone induces myelin-antigen-specific IL-4-secreting T cells in multiple sclerosis patients. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 88, n. 1, p. 28-34, 1998.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll receptors and pathogen resistance. **Cell Microbiol**, v. 5, n. 3, p. 143-153, 2003.

TALAVERA, S.; FELGINES, C.; TEXIER, O.; BESSON, C.; GIL-IZQUIERDO, A.; LAMAISON, J. L.; REMESY, C. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 10, p. 3902-3908, 2005.

TAN, L.; YANG, H. P.; PANG, W.; LU, H.; HU, Y. D.; LI, J.; LU, S. J.; ZHANG, W. Q.; JIANG, Y. G. Cyanidin-3-O-galactoside and blueberry extracts supplementation improves spatial memory and regulates hippocampal ERK expression in senescence-accelerated mice. **Biomed Environ Sci**, v. 27, n. 3, p. 186-196, 2014.

TERCI, D. B.; ROSSI, A. V. Indicador natural de pH: usando papel ou solução? **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 684-688, 2002.

TILBERY, C. P.; FELIPE, E.; MOREIRA, M. A.; MENDES, M. F.; FRANCA, A. S. [Interferon beta 1-a in multiple sclerosis: 1-year experience in 62 patients]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 58, n. 2B, p. 452-459, 2000b.

TILBERY, C. P.; MOREIRA, M. A.; MENDES, M. F.; LANA-PEIXOTO, M. A. [Recommendations for the use of immunomodulatory drugs in multiple sclerosis: the BCTRIMS consensus] [Brazilian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 58, n. 3A, p. 769-776, 2000a.

TSUDA, T. Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies. **Mol Nutr Food Res**, v. 56, n. 1, p. 159-170, 2012.

ULLAH, I.; PARK, H. Y.; KIM, M. O. Anthocyanins protect against kainic acid-induced excitotoxicity and apoptosis via ROS-activated AMPK pathway in hippocampal neurons. **CNS Neurosci Ther**, v. 20, n. 4, p. 327-338, 2014.

VAN HUNG, P. Phenolic compounds of cereals and their antioxidant capacity. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 2014.

VAUZOUR, D. Effect of flavonoids on learning, memory and neurocognitive performance: relevance and potential implications for Alzheimer's disease pathophysiology. **J Sci Food Agric**, v. 94, n. 6, p. 1042-1056, 2014.

VEPSALAINEN, S.; KOIVISTO, H.; PEKKARINEN, E.; MAKINEN, P.; DOBSON, G.; MCDOUGALL, G. J.; STEWART, D.; HAAPASALO, A.; KARJALAINEN, R. O.; TANILA, H.; HILTUNEN, M. Anthocyanin-enriched bilberry and blackcurrant extracts modulate amyloid precursor protein processing and alleviate behavioral abnormalities in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 1, p. 360-370, 2013.

WAXMAN, S. G.; CRANER, M. J.; BLACK, J. A. Na⁺ channel expression along axons in multiple sclerosis and its models. **Trends Pharmacol Sci**, v. 25, n. 11, p. 584-591, 2004.

WEISS, N.; MILLER, F.; CAZAUBON, S.; COURAUD, P. O. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1788, n. 4, p. 842-857, 2009.

WHITING, D. A. Natural phenolic compounds 1900-2000: a bird's eye view of a century's chemistry. **Nat Prod Rep**, v. 18, n. 6, p. 583-606, 2001.

WHO. Atlas Multiple Sclerosis: Resources in the World. © **World Health Organization**, p. 15, 2008.

WILLIAMS, C. M.; EL MOHSEN, M. A.; VAUZOUR, D.; RENDEIRO, C.; BUTLER, L. T.; ELLIS, J. A.; WHITEMAN, M.; SPENCER, J. P. Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. **Free Radic Biol Med**, v. 45, n. 3, p. 295-305, 2008.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. **Free Radic Biol Med**, v. 52, n. 1, p. 35-45, 2012.

XIAO, A. Y.; WEI, L.; XIA, S.; ROTHMAN, S.; YU, S. P. Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons. **J Neurosci**, v. 22, n. 4, p. 1350-1362, 2002.

YEUNG, M. S.; ZDUNEK, S.; BERGMANN, O.; BERNARD, S.; SALEHPOUR, M.; ALKASS, K.; PERL, S.; TISDALE, J.; POSSNERT, G.; BRUNDIN, L.; DRUID, H.; FRISEN, J. Dynamics of oligodendrocyte generation and myelination in the human brain. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 766-774, 2014.

YONG, V. W.; CHABOT, S.; STUVE, O.; WILLIAMS, G. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. **Neurology**, v. 51, n. 3, p. 682-689, 1998.

YOSHIDA, T.; HATANO, T.; ITO, H. Chemistry and function of vegetable polyphenols with high molecular weights. **Biofactors**, v. 13, n. 1-4, p. 121-125, 2000.

YOSHIMURA, M. [Structure elucidation of antioxidative polyphenols and their biological properties]. **Yakugaku Zasshi**, v. 134, n. 9, p. 957-964, 2014.

YODIM, K. A.; DOBBIE, M. S.; KUHNLE, G.; PROTEGGENTE, A. R.; ABBOTT, N. J.; RICE-EVANS, C. Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. **J Neurochem**, v. 85, n. 1, p. 180-192, 2003.

YODIM, K. A.; QAISER, M. Z.; BEGLEY, D. J.; RICE-EVANS, C. A.; ABBOTT, N. J. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. **Free Radic Biol Med**, v. 36, n. 5, p. 592-604, 2004.

YOUNG, E. A.; FOWLER, C. D.; KIDD, G. J.; CHANG, A.; RUDICK, R.; FISHER, E.; TRAPP, B. D. Imaging correlates of decreased axonal Na⁺/K⁺ ATPase in chronic multiple sclerosis lesions. **Ann Neurol**, v. 63, n. 4, p. 428-435, 2008.

ZAFRA-STONE, S.; YASMIN, T.; BAGCHI, M.; CHATTERJEE, A.; VINSON, J. A.; BAGCHI, D. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. **Mol Nutr Food Res**, v. 51, n. 6, p. 675-683, 2007.

ZEISEL, S. H. Regulation of "nutraceuticals". **Science**, v. 285, n. 5435, p. 1853-1855, 1999.

ZHANG, L. N.; SUN, Y. J.; PAN, S.; LI, J. X.; QU, Y. E.; LI, Y.; WANG, Y. L.; GAO, Z. B. Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase, a potent neuroprotective modulator against Alzheimer disease. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 27, n. 1, p. 96-103, 2013.

ZOU, T. B.; FENG, D.; SONG, G.; LI, H. W.; TANG, H. W.; LING, W. H. The role of sodium-dependent glucose transporter 1 and glucose transporter 2 in the absorption of cyanidin-3-o-beta-glucoside in Caco-2 cells. **Nutrients**, v. 6, n. 10, p. 4165-4177, 2014.

APÊNDICE



Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
em parceria com o
Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra

Resultados preliminares do Doutoramento Sanduíche
PDSE-CAPES

Mecanismos protetores das antocianinas (*Vitis vinifera*) em insultos excitotóxicos induzidos pela privação de glicose e oxigênio e por agonistas glutamatérgicos em culturas primárias de neurônios de hipocampo de ratos

Doutorando: Fabiano Barbosa Carvalho

Orientadora: Prof. Dra. Cinthia Melazzo de Andrade

Co-orientadora no Exterior: Prof. Dra. Ana Luísa Carvalho

Coimbra, Portugal

2014-2015

Resumo

A isquemia cerebral é um evento patológico no qual o sistema nervoso está sujeito a uma redução no suporte de oxigênio e glicose (OGD) em virtude de uma piora no fluxo sanguíneo. Além da deficiência de glicose e oxigênio, a hiperestimulação de receptores glutamatérgicos já foi relacionada com a morte induzida em processos isquêmicos e antagonistas seletivos para AMPA e NMDA são capazes de reverter os efeitos deletérios induzidos pela OGD. Antocianinas (ANT) são fitonutrientes distribuídos em vegetais e evidências apontam seus efeitos benéficos em modelos experimentais que mimetizam diversas doenças neurológicas. No entanto estudos que apresentem os alvos moleculares e mecanismos protetores das antocianinas perante processos excitotóxicos ainda não foram elucidados. O foco deste estudo foi investigar os mecanismos protetores das ANT obtidas da casca da uva em modelos experimentais *in vitro* para isquemia cerebral. Para isto culturas de neurônios de hipocampo foram expostas a insultos excitotóxicos induzidos pela hiperestimulação de receptores de glutamato e pela OGD. A mortalidade neuronal foi investigada pela liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) e pela morfologia nuclear utilizando corantes de núcleo Hoesch e Iodeto de Propídeo (PI). Através de técnicas de Western-Blot foram avaliados a expressão e fosforilação de diferentes cinases envolvidas em vias de sinalização que regulam a morte e a sobrevivência celular. Os resultados preliminares mostraram que as ANT foram capazes de reverter o aumento na liberação da LDH e o aumento no número de células mortas por apoptose induzidos pela OGD até 6 horas pós insulto. As ANT também foram capazes de reverter o aumento na liberação de LDH induzido por AMPA e por NMDA. Estes compostos revertem o aumento no número de células mortas por apoptose e por necrose primária induzida pelo NMDA. Um dos grandes achados deste estudo mostrou que as ANT também foram capazes de reverter o aumento no número de células mortas por necrose secundária. Estes resultados nos mostram que as ANT são capazes de reduzir a morte neuronal nestes modelos de excitotoxicidade. No entanto, a busca por evidências que venham a explicar como estes fitonutrientes agem no sistema nervoso ainda é pobremente descrito na literatura. O presente estudo ainda está em processo de desenvolvimento e as vias de sinalização envolvidas nestes processos seguem sendo investigadas. Com estes achados, pretende-se esclarecer os mecanismos de ação das ANT contribuindo assim, na busca por tratamentos coadjuvantes que possam auxiliar na prevenção ou reversão de danos neuronais frente a processos isquêmicos.

Palavras chave: Isquemia, Toxicidade, Hipocampo, Antocianinas.

Introdução

A isquemia cerebral é um evento patológico no qual o sistema nervoso está sujeito a uma redução no suporte de oxigênio e glicose em virtude de uma piora no fluxo sanguíneo. Esta ineficiência na manutenção e suporte de nutrientes e gases ao tecido culmina em alterações bioquímicas em funções vitais aos neurônios levando a injúria celular. Em relação a isquemia cerebral global, sabe-se que os neurônios do hipocampo, especialmente os neurônios piramidais da região CA1, são mais suscetíveis aos danos ocasionados pelo processo isquêmico o qual ocasiona uma morte bastante acentuada nestas populações de células horas ou dias após o insulto. O intervalo entre o insulto isquêmico e o aparecimento dos primeiros sinais clínicos tem sido alvo de estudo em virtude da ativação de genes e vias de sinalização que podem contribuir para a sobrevivência celular; ou para uma morte dos neurônios (PAPADOPOULOS; GIFFARD; BELL, 2000a; b; FERNANDES et al., 2014). Um grande esforço no meio científico tem sido feito para a identificação de genes e vias de sinalização que participam na resposta das células do hipocampo frente a isquemia cerebral global isquemia *in vivo*. Em paralelo, a isquemia cerebral global pode ser simulada *in vitro* através da privação de glicose e oxigênio (OGD) em culturas primárias de hipocampo ou fatias organotípicas (FALCAO et al., 2007; FERNANDES et al., 2014; VIEIRA et al., 2014). Neste sentido, embora se admita que várias funções celulares estão comprometidas, a compreensão de como este processo correlaciona-se com a morte seletiva e retardada de neurônios do hipocampo ainda é incerto. A busca por mecanismos que expliquem estes eventos requerem investigações em nível molecular, o que é mais facilmente realizados utilizando modelos *in vitro*.

Recentemente, foi descrito que a OGD modifica a expressão tanto de genes de sobrevivência e morte celular, como uma variedade de genes que regulam as funções sinápticas (FERNANDES et al., 2014). Falhas na atividade sináptica é um dos eventos tardios presentes na isquemia cerebral. Dentre os fatores mais proeminentes neste processo estão o desequilíbrio energético ocasionado pela falta de O₂ molecular e pela glicose, importante substrato para vias catabólicas (NORABERG et al., 2005; IJIMA, 2006). Em adição, também se encontram a piora na despolarização neuronal e na sinalização dos neurotransmissores (KIM, Y. D. et al., 2002; HOFMEIJER; VAN PUTTEN, 2012).

Dentre estes sistemas de neurotransmissão, destacam-se os receptores excitatórios AMPA e NMDA, importantes canais iônicos que atuam no sistema glutamatérgico. Tais receptores já foram relacionados com a morte, ou sobrevivência, de neurônios de hipocampo

induzidos pela OGD. Alterações na expressão da subunidade destes receptores já foram reportados; e em paralelo, antagonistas seletivos para AMPA e NMDA reverteram os efeitos deletérios induzidos pela OGD (FERNANDES et al., 2014; VIEIRA et al., 2014). Embora não se saiba realmente o envolvimento destes receptores para a evolução do dano induzido pela OGD em neurônios, a ativação do sistema glutamatérgico assume um importante envolvimento com a evolução da morte neuronal uma vez que inibidores destes receptores apresentam efeito protetor sobre a sobrevivência celular por reduzir as correntes de Ca^{2+} e a excitotoxicidade (NOH et al., 2005; FERNANDES et al., 2014).

Em 2006, um dos primeiros estudos com antocianinas mostrou seu efeito protetor em células PC12 submetidas a OGD e num modelo de isquemia global em ratos (KANG et al., 2006). Mesmo sem um mecanismo traçado, Kang e colaboradores (2006) verificaram que a cianidina-3-*O*- β -d-glucopiranosídeo isolada da *mulberry*, fruta semelhante a amora brasileira, reduziu a morte de células PC12 e de populações neuronais em ratos frente a OGD. Em seguida, uma outra antocianina, a cianidina-3-*O*-glicosídeo, foi utilizada experimentalmente por Min (MIN et al., 2011) perante a isquemia cerebral focal. Tal procedimento utiliza de uma oclusão da artéria cerebral. Min e colaboradores (2001) corroboraram os achados anteriores, e mostraram que 2 mg/kg de antocianinas induzem uma melhora nos sinais clínicos comportamentais apresentados pelos roedores, uma redução na área do infarto e uma melhora na atividade de enzimas antioxidantes.

As antocianinas são fitonutrientes que possuem grupos fenólicos em sua estrutura química e estão distribuídas amplamente em frutas e vegetais. Estudos com estes compostos focando a neurotoxicidade e proteção ganharam força nos últimos anos; e evidências de seus efeitos benéficos começaram a ser relatados perante modelos que mimetizam diversas condições patológicas. Por exemplo, antocianinas são capazes de proteger neurônios de hipocampo contra a toxicidade e a apoptose induzida por ácido kaínico (ULLAH; PARK; KIM, 2014), contra os efeitos deletérios em modelos *in vitro* e *in vivo* para Parkinson (KIM, H. G. et al., 2010; ROGHANI et al., 2010; STRATHEARN et al., 2014; SUBASH et al., 2014) e para doença de Alzheimer (SHIH et al., 2010; HO et al., 2013; QIN; ZHANG; QIN, 2013; VEPSALAINEN et al., 2013; BADSHAH; KIM; KIM, 2014; GUTIERRES et al., 2014)

Conforme descrito acima, os achados obtidos através de estudos prévios com antocianinas têm apontado um importante papel deste fitonutriente. No entanto os alvos moleculares e mecanismos protetores ainda não foram elucidados. Desta forma, o presente estudo visa investigar as propriedades protetoras *in vitro* das antocianinas em culturas

primárias de neurônios de hipocampo e encontrar evidências sólidas que contribuam para explicar como as antocianinas atuam na prevenção ou reversão de danos frente a processos isquêmicos.

Material e Métodos

O presente estudo está sendo desenvolvido no Laboratório de Sinapses Glutamatérgicas e Morte Neuronal do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra (Portugal).

Culturas primárias de neurônios de hipocampo

As culturas primárias de neurônios de hipocampo foram preparadas conforme previamente descrito (CALDEIRA et al., 2007). Foram utilizados embriões de ratos *Wistar* de 18-19 dias. Após o isolamento, os hipocampos foram incubados com tripsina (0,06%, 15 min, 37 °C; GIBCO *Invitrogen*) e desoxirribonuclease I (5,36 mg/mL), em meio de Hanks isento de Ca^{2+} e Mg^{2+} (Hanks: 5,36 mM KCl; 0,44 mM KH_2PO_4 ; 137 mM NaCl; 4,16 mM NaHCO_3 ; 0,34 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 5 mM glicose; 1 mM piruvato de sódio; 10 mM HEPES e 0,001% fenol vermelho). Os hipocampos foram lavados com meio de Hanks contendo 10% de soro fetal bovino para parar a atividade da tripsina. Em seguida, os hipocampos foram transferidos para o meio Neurobasal (GIBCO *Invitrogen*) acrescido de suplemento 27 (diluição 1:50; GIBCO *Invitrogen*), 25 μM glutamato, 0,5 mM glutamina e 0,12 mg/mL gentamicina). As células foram dissociadas nesta solução e então transferidas para placas de cultura com 24 poços ($91,6 \times 10^3$ células/ cm^2), revestidas com poli-D-lisina (0,1 mg/mL). As culturas foram mantidas em incubadora com 5% CO_2 /95% ar atmosférico, a 37 °C, por 15 dias.

Estímulos excitotóxicos por agonistas glutamatérgicos

As culturas foram estimuladas com 100 μM de AMPA ou 100 μM de NMDA (Sigma) em solução basal (134 mM NaCl; 4 mM KCl; 1,4 mM MgCl_2 ; 2,5 mM de CaCl_2 ; 6 mM de glicose; 10 mM de HEPES) por 20 minutos (exposição) e em seguida incubadas com o tampão de cultura original (isento de AMPA e NMDA) por 240 minutos (incubação). A estimulação pelo NMDA foi realizada na ausência de Mg^{2+} , para avaliar uma resposta neuronal máxima. A presença de antocianinas (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) nos meios foi variada e está descrita conforme os protocolos abaixo. A concentração escolhida foi baseada numa curva de

concentração em que não se observa alterações na viabilidade neuronal (liberação da lactato desidrogenase):

- a) Presença de antocianinas somente durante o estímulo com agonistas glutamatérgicos (exposição).
- b) Presença de antocianinas durante o estímulo com agonistas glutamatérgicos (*exposição*) e o período pós-insulto (*incubação*).
- c) Presença de antocianinas somente durante o período pós-insulto (*incubação*).
- d) Presença de antocianinas somente uma hora pós-estímulo com agonistas, durante o período pós-insulto (*incubação*).

Privações de glicose e oxigênio (OGD)

O protocolo experimental foi baseado em estudos prévios (FERNANDES et al., 2014; VIEIRA et al., 2014). Neurônios do hipocampo foram incubados em meio sem glicose (116 mM NaCl, 25 mM de sacarose, 10 mM de HEPES, 5,4 mM KCl, 0,8 mM de MgSO₄, 1 mM de NaH₂PO₄, 1,8 mM de CaCl₂, 25 mM de NaHCO₃) sob atmosfera anaeróbica (10% de H₂, 85% de N₂, CO₂ a 5%; Forma de Sistema Anaeróbio, Thermo Fisher Scientific) a 37°C durante 2 horas (exposição). Após o insulto induzido pela OGD, o tampão foi substituído pelo meio de cultura já condicionado pelas células, o qual permaneceu sob condições de humidificação de 5% de CO₂/95% de ar atmosférico. Este período pós-insulto foi de 24 horas (incubação). Neurônios controles foram incubados no mesmo tampão acima descrito, suplementado com 25 mM de glicose (na ausência de sacarose), e mantidos sob humidificação de 5% de CO₂/95% de ar na incubadora a 37°C. A presença de antocianinas ocorreu conforme os protocolos descritos abaixo:

- a) Presença de antocianinas durante o estímulo OGD (exposição) e durante o período pós-insulto (incubação).
- b) Presença de antocianinas somente no período pós-insulto (incubação).
- c) Presença de antocianinas somente durante o estímulo OGD (*exposição*).
- d) Presença de antocianinas durante o estímulo OGD (*exposição*) e nas primeiras 4 horas no período pós-insulto (*incubação*).
- e) Presença de antocianinas somente nas primeiras 4 horas no período pós-insulto (*incubação*).
- f) Presença de antocianinas num intervalo de 6 horas, 6 horas pós-estímulo (*incubação*).

Análises da Morfologia Nuclear

Para a análise da morfologia nuclear, os procedimentos seguiram metodologia descrita previamente (FERNANDES et al., 2014; VIEIRA et al., 2014). Os neurônios foram fixados 24 horas após a OGD a temperatura ambiente em 4% sacarose/4% paraformaldeído preparado em solução PBS e incubado com reagente fluorescente Hoechst 33342 (1 mg/ml, *Molecular Probes*) por 15 min. As lamelas foram montadas sobre laminas de vidro com *Dako mounting médium* (*Thermo Scientific*) e examinados com auxílio de *Zeiss Axiovert 200 fluorescence microscope*. As células permeáveis e o DNA corado pelo Hoechst 33342 apresentam núcleo com tamanho normal, regular e fluorescência difusa azul, enquanto que células danificadas apresentam coloração azul intenso, núcleos picnóticos com cromatina condensada e fragmentada. Os experimentos foram realizados em triplicata e aproximadamente 400 células foram contadas em campos ópticos selecionados randomicamente. A morte celular foi expressa como a percentagem de células mortas em relação ao número total de células contadas.

Diferenciações entre necrose primária e secundária e apoptose

O protocolo experimental foi baseado no seguinte estudo prévio (VIEIRA et al., 2014). Para esse efeito, os neurônios foram incubados com corantes nucleares como iodeto de propídio (PI, 2 µg/mL) e Hoechst 33342 (2 µg/mL) durante 15 min a 37°C. Em seguida, as células foram analisadas imediatamente sob microscopia de fluorescência para a incorporação de PI e condensação da cromatina. As membranas celulares são impermeáveis à PI, assim, este corante só penetra as células mediante vazamento de membrana. Assim, PI é considerado como um marcador necrótico, uma vez que poros na membrana é uma das principais características de morte celular por necrose. Quando usado em um sistema primário de cultura, deveríamos considerar que algumas células que ativam apoptose podem sofrer necrose secundária. Por esta razão, não poderíamos atribuir a captação de PI apenas a necrose primária. Por outro lado, as células são permeáveis ao corante Hoechst 33342, servindo para analisar a morfologia nuclear, pontos de condensação da cromatina e a picnose, que classificam as células como mortas por apoptose. Para a morte neuronal semelhante a necrose, foram considerados células que são positivas para a coloração de PI, mas na ausência de picnose. Pelo menos 500 células foram contadas em cada lamela. Os resultados foram expressos como a percentagem de morte celular por necrose (PI positiva sem picnose/número total de células) ou a percentagem de morte celular tipo-apoptose (núcleos tipo-apoptose/número total de células).

Ensaio da liberação e atividade da lactato desidrogenase (LDH)

O procedimento experimental ocorreu de acordo com estudos prévios (LOBO et al., 2011). Para o ensaio, o meio condicionado foi coletado após os tempos indicados de incubação após a exposição aos agonistas, OGD ou condições controles. A atividade da LDH foi determinada usando um kit comercial (*CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay*, Promega, Madison, WI), conforme indicado nas instruções dos fornecedores. A percentagem de LDH liberada foi determinada como a razão entre a atividade da LDH no meio extracelular e a atividade da LDH total, obtida após a lise completa com triton x-100. A percentagem de células mortas foi calculada relativamente para células tratadas com o tampão de lise, sendo considerado como 100%. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em experimentos independentes.

Preparo da amostra, SDS-PAGE e Western blotting

O preparo das amostras foi realizado de acordo com estudos prévios (Caldeira et al., 2007 a,b). A análise de *Western blot* foi realizada pelo sistema Bio-Rad. As proteínas foram detectadas e analisadas com os softwares *Molecular Imager VersaDoc 3000* e *Quantity One* (Bio Rad, USA). Resumidamente, as proteínas foram separadas por *SDS-PAGE* em gel de poliacrilamida 10%, transferidas para membrana de PVDF e, em seguida, inicia-se a imunoblotagem. Os blotes serão incubados com anticorpos primários (*overnight* a 4 °C), lavados e incubados com anticorpos secundários (diluição 1:20.000; 1 hora a temperatura ambiente). Os anticorpos primários foram destinados para os seguintes alvos moleculares: expressão e fosforilação da JNK; expressão e fosforilação da c-Jun; expressão e fosforilação do NF-kB p65; expressão e fosforilação da p38; expressão e fosforilação da AKT; expressão e fosforilação da ERK; expressão e fosforilação da CaMKII- α ; expressão e fosforilação da GSK3- β .

Alvos moleculares

Os alvos moleculares investigados neste estudo foram: expressão e fosforilação da JNK; expressão e fosforilação da c-Jun; expressão e fosforilação da p38; expressão e fosforilação da AKT; expressão e fosforilação da ERK; expressão e fosforilação da CaMKII alfa ; expressão e fosforilação da GSK3-Beta.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA), utilizando o teste *post-hoc* adequado com 95% de significância ($p < 0,05$). Os valores foram expressos como a média \pm S.E.M.

Resultados e Discussões

Antocianinas previnem a liberação da LDH e apoptose celular em cultura de neurônios de hipocampo submetidos a OGD

A figura 1 mostra o efeito dos tratamentos com antocianinas 100 $\mu\text{g/ml}$ e o estímulo OGD sob a liberação da enzima LDH em diferentes protocolos de exposição (*exposure*) e incubação (*incubation*) (A-G). Pode-se observar no gráfico A que a incubação com antocianinas durante as 2 horas de exposição e 24 horas de incubação mostrou-se excitotóxica para os neurônios de hipocampo. O mesmo efeito foi visto no gráfico B onde antocianinas presentes durante 24 horas de incubação também são excitotóxicas. No gráfico C a presença de antocianinas 12 horas pós-estímulo não apresentou excitotoxicidade, mas também não foi capaz de reverter o efeito induzido pela OGD. Baseado nestes achados os tempos de incubação com antocianinas foram reduzidos e voltados para um intervalo de tempo mais próximo ao insulto.

No gráfico D pode-se perceber que a presença de antocianinas somente durante 2 horas de estímulo foi capaz de prevenir o aumento na liberação da LDH induzido pela OGD. O mesmo efeito foi notado quando as antocianinas estiveram presentes no estímulo e 4 horas pós-estímulo (E) e somente 4 horas pós-estímulo (F). Estes resultados mostram que as antocianinas protegem a morte de neurônios nas fases iniciais após OGD.

Na tentativa de encontrar uma janela temporal mais distante ao processo de OGD no qual exista uma proteção das antocianinas, foram realizadas incubações de antocianinas 6 horas pós OGD, durante 6 horas (um intervalo curto com a presença de antocianinas afim desta não se tornar excitotóxica). Pode-se notar no gráfico G que as antocianinas podem prevenir a morte de neurônios até 6 horas pós OGD. Este mesmo protocolo foi realizado para os estudos de morfologia nuclear para complementar os achados obtidos com a liberação da LDH. Pode-se perceber que as antocianinas revertem o aumento no número de células mortas para o corante Hoescht 33343. Pela análise morfológica nuclear também se notou uma morte com padrão de apoptose. Além disto, as antocianinas reduziram o número de núcleos picnóticos e marcados intensamente pelo corante.

Antocianinas previnem a liberação da LDH em cultura de neurônios de hipocampo submetidos a insultos excitotóxicos induzidos por AMPA e NMDA

A figura 2 mostra que antocianinas nas concentrações entre 1-100 µg/mL por 2 horas não aumentam a liberação de LDH *per se*. A figura 3 mostra a liberação da LDH após a exposição com AMPA (A-D) e NMDA (E-H). Pode-se observar que a presença de antocianinas durante o estímulo de 20 minutos com os agonistas não foi capaz de prevenir a liberação de LDH induzida por AMPA (A) e NMDA (E). A presença de antocianinas durante os 20 minutos de estímulo e 2 horas de incubação foi capaz de prevenir o aumento na liberação de LDH induzida por AMPA (B) e NMDA (F). O mesmo efeito foi visto quando as antocianinas estiveram presentes somente nas 2 horas de incubação.

Visto que as antocianinas conseguem prevenir a morte induzida pelos agonistas, um último protocolo foi realizado afim de tentar encontrar uma janela temporal mais distante dos estímulos no qual as antocianinas continuam a impedir a morte neuronal. Foi encontrado que as antocianinas 2 horas após os estímulos conseguem reverter o aumento na liberação da LDH induzido por AMPA (D) e NMDA (H).

Antocianinas previnem a indução de apoptose e necrose em cultura de neurônios de hipocampo submetidos a insultos excitotóxicos induzidos por NMDA

Visto que as antocianinas 2 horas após o estímulo com NMDA impedem a liberação de LDH, este protocolo foi utilizado para os estudos de morfologia nuclear. Além disto, a escolha do uso de NMDA foi baseada no fato de que este agonista apresenta excitotoxicidade superior ao AMPA. A figura 3 mostra que as antocianinas foram capazes de impedir o número de células mortas para o Hoescht 33342 (A). No entanto, a morfologia nuclear mostrou que o perfil de morte induzido pelo NMDA não segue um perfil somente apoptótico no qual os núcleos mostram-se picnóticos e intensamente corados pelo corante. Em virtude disso, foi realizado o uso concomitante de corantes Hoescht e iodeto de propídeo (PI), e foi possível determinar o tipo de morte relacionada aos estímulos com NMDA.

Pode-se perceber que as antocianinas reduziram o número de células PI positivas, ou seja, as antocianinas reduziram o número de células mortas por necrose. Em adição, também foi encontrado que as antocianinas reduziram o número de células com característica morfológica para necrose primária e secundária.

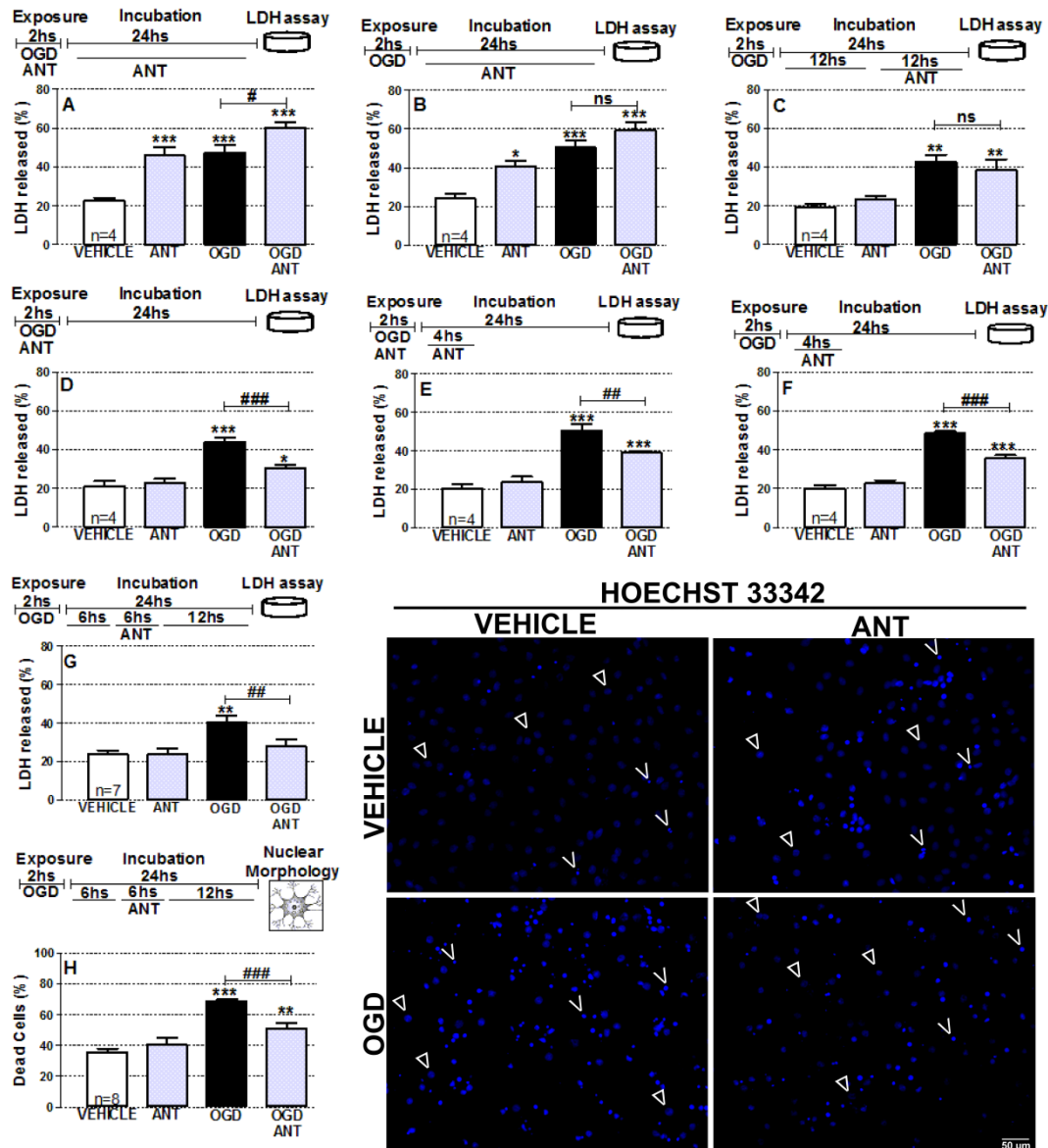
Antocianinas não apresentam afinidade por receptores NMDA.

A figura 5 mostra que concentrações até 100 µg/mL não deslocam o MK-801, mostrando a ausência de afinidade destes compostos para o receptor NMDA.

Conclusão

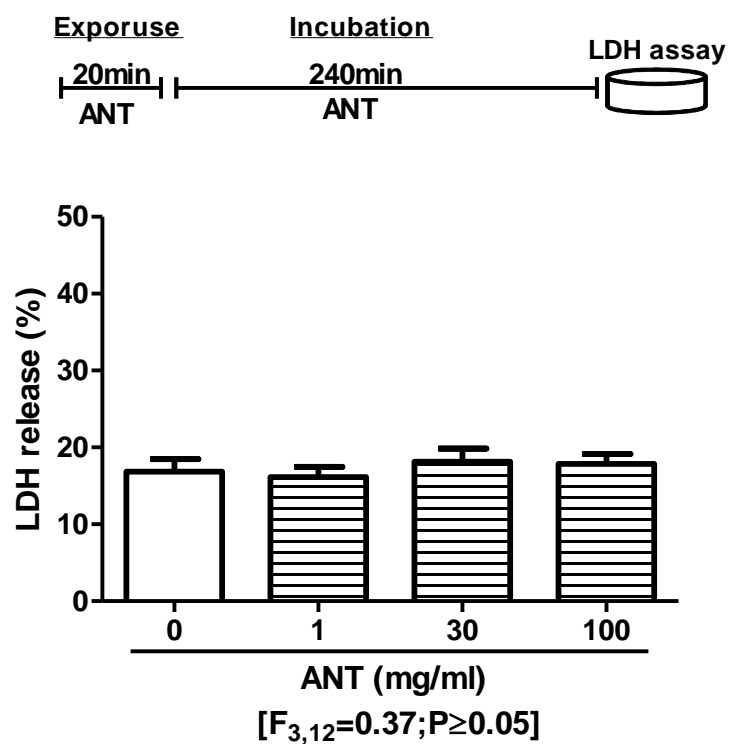
Os resultados preliminares mostram evidências promissoras sobre a neuroproteção das antocianinas perante a morte induzida por agonistas glutamatérgicos e pela OGD. Dentre estes se destaca a capacidade destes compostos em reverter a morte induzida numa janela temporal distante ao momento do insulto. Antocianinas reverterem a morte pela liberação da LDH uma hora pós-estímulo via agonistas glutamatérgicos e até seis horas pós-OGD. A análise da morfologia nuclear corroborou com os resultados da liberação da LDH. Além disto, as antocianinas foram capazes de impedir que as células expostas a NMDA tenham uma morte tipo-necrótica. A redução da necrose secundária mostra que as antocianinas impedem que as células que entram em processo apoptótico migrem para um processo necrótico. Para ambos os protocolos experimentais (exposição ao NMDA e a OGD) serão investigados a expressão e fosforilação da JNK, expressão e fosforilação da c-Jun, expressão e fosforilação da p38, expressão e fosforilação da AKT, expressão e fosforilação da ERK, expressão e fosforilação da CaMKII- α e expressão e fosforilação da GSK3- β . O presente estudo segue em processo de desenvolvimento e a partir destas análises poderemos determinar possíveis alvos moleculares de ação das antocianinas na prevenção da morte celular.

Figura 1



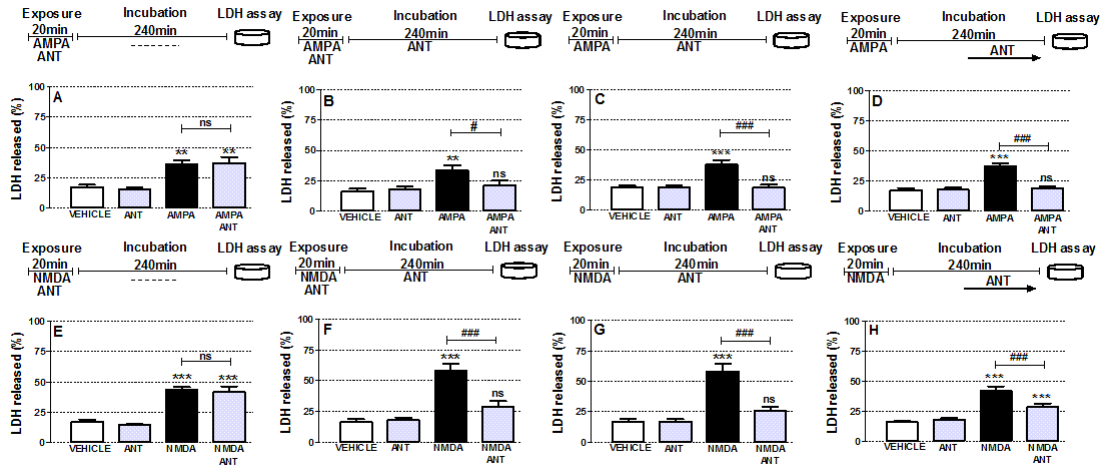
Legenda: Efeito da exposição de culturas de neurônios de hipocampo a antocianinas (ANT, 100 µg/mL) e a insultos de deprivação de glicose e oxigênio (OGD, 2 horas) sobre a liberação da lactato desidrogenase (LDH): efeito das antocianinas durante o estímulo OGD e pós-insulto (A); efeito das antocianinas somente pós-insulto (B) e 12 horas pós-insulto (C); efeito das antocianinas durante o estímulo OGD (D); efeito das antocianinas durante o estímulo OGD e 4 horas pós-insulto (E); efeito das antocianinas somente 4 horas pós-insulto (F) e efeito das antocianinas 6 horas pós-insulto (G). Morfologia nuclear de neurônios submetidos a OGD e expostos com antocianinas num intervalo de 6 horas, 6 horas pós estímulo (H). Seta fechada aponta núcleos considerados como controle. Seta aberta representa núcleos considerados apoptóticos. *Denota diferença significativa em relação ao grupo veículo. #Denota diferença significativa em relação ao grupo OGD. Anova de duas vias seguido pelo *post-hoc* de Bonferroni (n=4/10).

Figura 2



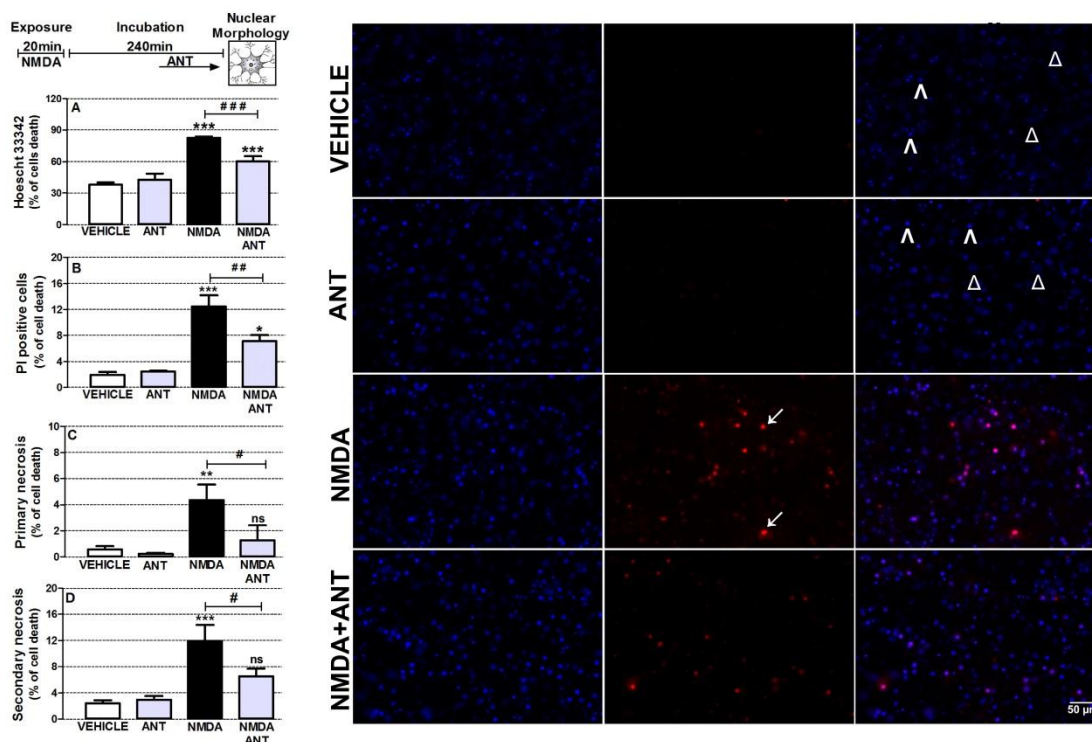
Legenda: Efeito da exposição de culturas de neurônios hipocâmpais com diferentes concentrações de antocianinas (ANT, 1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante o 20 e 240 minutos sobre a liberação da lactato desidrogenase (LDH). Anova de uma seguido pelo *post-hoc* de Student Newman Keuls (n=3).

Figura 3



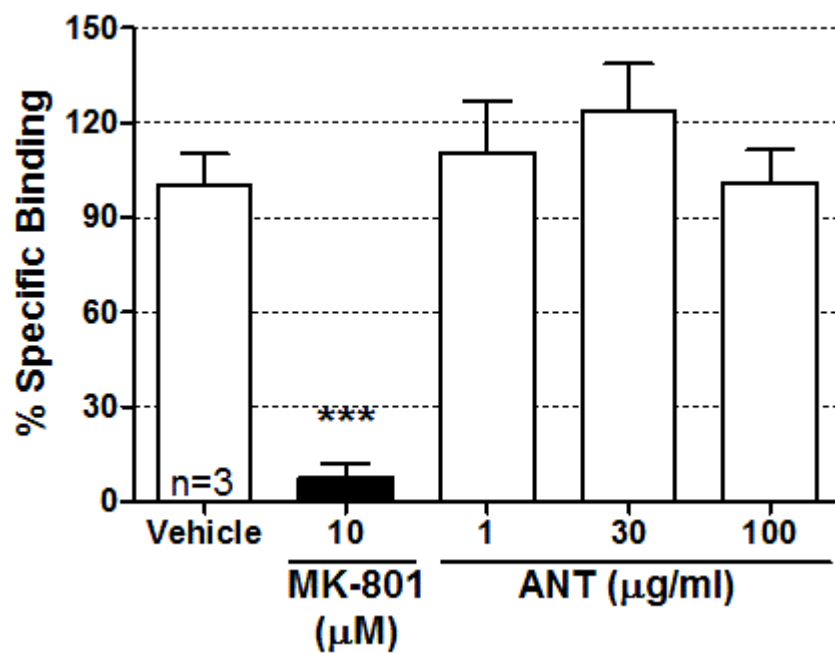
Legenda: Efeito da exposição de culturas de neurônios de hipocampo com antocianinas (ANT, 100 $\mu\text{g/mL}$) e a insultos pelos agonistas glutamatérgicos (AMPA ou NMDA, 100 μM , 20 minutos) sobre a liberação da lactato desidrogenase (LDH): efeito das antocianinas durante o estímulo AMPA (A); efeito das antocianinas durante o estímulo AMPA e pós-insulto (B); efeito das antocianinas somente pós-insulto (C) e efeito das antocianinas 1 hora pós-insulto (D); efeito das antocianinas durante o estímulo NMDA (E); efeito das antocianinas durante o estímulo NMDA e pós-insulto (F); efeito das antocianinas somente pós-insulto (G) e efeito das antocianinas 1 hora pós-insulto (H). *Denota diferença significativa em relação ao grupo veículo. #Denota diferença significativa em relação ao grupo AMPA/NMDA. Anova de duas vias seguido pelo *post-hoc* de Bonferroni ($n=4/10$).

Figura 4



Legenda: Morfologia nuclear de neurônios submetidos a insultos por NMDA (100 μ M, 20 minutos) e expostos com antocianinas num intervalo de 1 hora, 1 hora pós-estímulo. Seta fechada aponta núcleos considerado como controle. Seta aberta representa núcleos considerados apoptóticos. \rightarrow Representa núcleos considerados necróticos. *Denota diferença significativa em relação ao grupo veículo. #Denota diferença significativa em relação ao grupo NMDA. Anova de duas vias seguido pelo *post-hoc* de Bonferroni (n=4/10).

Figura 5



Legenda: Efeito das antocianinas (1-100 μg/mL) e MK-801 (10 μM) sobre a ligação do [³H]-MK-801 em membranas de cérebro de ratos. Dados expressos em média ± erro padrão (n=3/duplicata). ***p<0.001 comparado ao grupo veículo (Teste T de Student).

Referências Bibliográficas

BADSHAH, H.; KIM, T. H.; KIM, M. O. Protective effects of anthocyanins against amyloid beta-induced neurotoxicity in vivo and in vitro. **Neurochem Int**, v. 80, p 51-59, 2015.

CALDEIRA, M. V.; MELO, C. V.; PEREIRA, D. B.; CARVALHO, R. F.; CARVALHO, A. L.; DUARTE, C. B. BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. **Mol Cell Neurosci**, v. 35, n. 2, p. 208-219, 2007.

FALCAO, A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A.; BRITO, M. A.; BRITES, D. Influence of hypoxia and ischemia preconditioning on bilirubin damage to astrocytes. **Brain Res**, v. 1149, p. 191-199, 2007.

FERNANDES, J.; VIEIRA, M.; CARRETO, L.; SANTOS, M. A.; DUARTE, C. B.; CARVALHO, A. L.; SANTOS, A. E. In vitro ischemia triggers a transcriptional response to down-regulate synaptic proteins in hippocampal neurons. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e99958, 2014.

GUTIERRES, J. M.; CARVALHO, F. B.; SCHETINGER, M. R.; MARISCO, P.; AGOSTINHO, P.; RODRIGUES, M.; RUBIN, M. A.; SCHMATZ, R.; DA SILVA, C. R.; DE, P. C. G.; FARIAS, J. G.; SIGNOR, C.; MORSCH, V. M.; MAZZANTI, C. M.; BOGO, M.; BONAN, C. D.; SPANEVELLO, R. Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. **Life Sci**, v. 96, n. 1-2, p. 7-17, 2014.

HO, L.; FERRUZZI, M. G.; JANLE, E. M.; WANG, J.; GONG, B.; CHEN, T. Y.; LOBO, J.; COOPER, B.; WU, Q. L.; TALCOTT, S. T.; PERCIVAL, S. S.; SIMON, J. E.; PASINETTI, G. M. Identification of brain-targeted bioactive dietary quercetin-3-O-glucuronide as a novel intervention for Alzheimer's disease. **FASEB J**, v. 27, n. 2, p. 769-781, 2013.

HOFMEIJER, J.; VAN PUTTEN, M. J. Ischemic cerebral damage: an appraisal of synaptic failure. **Stroke**, v. 43, n. 2, p. 607-615, 2012.

IJIMA, T. Mitochondrial membrane potential and ischemic neuronal death. **Neurosci Res**, v. 55, n. 3, p. 234-243, 2006.

KANG, T. H.; HUR, J. Y.; KIM, H. B.; RYU, J. H.; KIM, S. Y. Neuroprotective effects of the cyanidin-3-O-beta-d-glucopyranoside isolated from mulberry fruit against cerebral ischemia. **Neurosci Lett**, v. 391, n. 3, p. 122-126, 2006.

KIM, H. G.; JU, M. S.; SHIM, J. S.; KIM, M. C.; LEE, S. H.; HUH, Y.; KIM, S. Y.; OH, M. S. Mulberry fruit protects dopaminergic neurons in toxin-induced Parkinson's disease models. **Br J Nutr**, v. 104, n. 1, p. 8-16, 2010.

KIM, Y. D.; SOHN, N. W.; KANG, C.; SOH, Y. DNA array reveals altered gene expression in response to focal cerebral ischemia. **Brain Res Bull**, v. 58, n. 5, p. 491-498, 2002.

LOBO, A. C.; GOMES, J. R.; CATARINO, T.; MELE, M.; FERNANDEZ, P.; INACIO, A. R.; BAHR, B. A.; SANTOS, A. E.; WIELOCH, T.; CARVALHO, A. L.; DUARTE, C. B.

Cleavage of the vesicular glutamate transporters under excitotoxic conditions. **Neurobiol Dis**, v. 44, n. 3, p. 292-303, 2011.

MIN, J.; YU, S. W.; BAEK, S. H.; NAIR, K. M.; BAE, O. N.; BHATT, A.; KASSAB, M.; NAIR, M. G.; MAJID, A. Neuroprotective effect of cyanidin-3-O-glucoside anthocyanin in mice with focal cerebral ischemia. **Neurosci Lett**, v. 500, n. 3, p. 157-161, 2011.

NOH, K. M.; YOKOTA, H.; MASHIKO, T.; CASTILLO, P. E.; ZUKIN, R. S.; BENNETT, M. V. Blockade of calcium-permeable AMPA receptors protects hippocampal neurons against global ischemia-induced death. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 34, p. 12230-12235, 2005.

NORABERG, J.; POULSEN, F. R.; BLAABJERG, M.; KRISTENSEN, B. W.; BONDE, C.; MONTERO, M.; MEYER, M.; GRAMSBERGEN, J. B.; ZIMMER, J. Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord**, v. 4, n. 4, p. 435-452, 2005.

PAPADOPOULOS, M. C.; GIFFARD, R. G.; BELL, B. A. Principles of gene therapy: potential applications in the treatment of cerebral ischaemia. **Br J Neurosurg**, v. 14, n. 5, p. 407-414, 2000a.

PAPADOPOULOS, M. C.; GIFFARD, R. G.; BELL, B. A. An introduction to the changes in gene expression that occur after cerebral ischaemia. **Br J Neurosurg**, v. 14, n. 4, p. 305-312, 2000b.

QIN, L.; ZHANG, J.; QIN, M. Protective effect of cyanidin 3-O-glucoside on beta-amyloid peptide-induced cognitive impairment in rats. **Neurosci Lett**, v. 534, n., p. 285-288, 2013.

ROGHANI, M.; NIKNAM, A.; JALALI-NADOUSHAN, M. R.; KIASALARI, Z.; KHALILI, M.; BALUCHNEJADMOJARAD, T. Oral pelargonidin exerts dose-dependent neuroprotection in 6-hydroxydopamine rat model of hemi-parkinsonism. **Brain Res Bull**, v. 82, n. 5-6, p. 279-283, 2010.

SHIH, P. H.; CHAN, Y. C.; LIAO, J. W.; WANG, M. F.; YEN, G. C. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. **J Nutr Biochem**, v. 21, n. 7, p. 598-605, 2010.

STRATHEARN, K. E.; YOUSEF, G. G.; GRACE, M. H.; ROY, S. L.; TAMBE, M. A.; FERRUZZI, M. G.; WU, Q. L.; SIMON, J. E.; LILA, M. A.; ROCHET, J. C. Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinsons disease. **Brain Res**, v. 1555, n., p. 60-77, 2014.

SUBASH, S.; ESSA, M. M.; AL-ADAWI, S.; MEMON, M. A.; MANIVASAGAM, T.; AKBAR, M. Neuroprotective effects of berry fruits on neurodegenerative diseases. **Neural Regen Res**, v. 9, n. 16, p. 1557-1566, 2014.

ULLAH, I.; PARK, H. Y.; KIM, M. O. Anthocyanins protect against kainic acid-induced excitotoxicity and apoptosis via ROS-activated AMPK pathway in hippocampal neurons. **CNS Neurosci Ther**, v. 20, n. 4, p. 327-338, 2014.

VEPSALAINEN, S.; KOIVISTO, H.; PEKKARINEN, E.; MAKINEN, P.; DOBSON, G.; MCDUGALL, G. J.; STEWART, D.; HAAPASALO, A.; KARJALAINEN, R. O.; TANILA, H.; HILTUNEN, M. Anthocyanin-enriched bilberry and blackcurrant extracts modulate amyloid precursor protein processing and alleviate behavioral abnormalities in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 1, p. 360-370, 2013.

VIEIRA, M.; FERNANDES, J.; CARRETO, L.; ANUNCIBAY-SOTO, B.; SANTOS, M.; HAN, J.; FERNANDEZ-LOPEZ, A.; DUARTE, C. B.; CARVALHO, A. L.; SANTOS, A. E. Ischemic insults induce necroptotic cell death in hippocampal neurons through the up-regulation of endogenous RIP3. **Neurobiol Dis**, v. 68, n., p. 26-36, 2014.