

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

**Pauline da Costa**

**NEUROPROTEÇÃO DO CASSIS (*Ribes nigrum* L.) E DE SUA  
ASSOCIAÇÃO COM O DONEPEZIL EM MODELO DE AMNÉSIA  
INDUZIDA POR ESCOPOLAMINA**

**Santa Maria, RS  
2019**

**Pauline da Costa**

**NEUROPROTEÇÃO DO CASSIS (*Ribes nigrum* L.) E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM  
O DONEPEZIL EM MODELO DE AMNÉSIA INDUZIDA POR ESCOPOLAMINA**

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vera Maria Melchiors Morsch

Santa Maria, RS  
2019

da Costa, Pauline  
NEUROPROTEÇÃO DO CASSIS (Ribes nigrum L.) E DE SUA  
ASSOCIAÇÃO COM O DONEPEZIL EM MODELO DE AMNÉSIA INDUZIDA  
POR ESCOPOLAMINA / Pauline da Costa.- 2019.  
165 p.; 30 cm

Orientadora: Vera Maria Melchiors Morsch  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica, RS, 2019

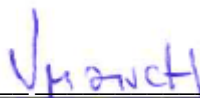
1. Alzheimer 2. Antocianinas 3. Antioxidantes 4.  
Sistema colinérgico 5. Sistema purinérgico I. Melchiors  
Morsch, Vera Maria II. Título.

Pauline da Costa

**NEUROPROTEÇÃO DO CASSIS (*Ribes nigrum* L.) E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM O DONEPEZIL EM MODELO DE AMNÉSIA INDUZIDA POR ESCOPOLAMINA**

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

**Aprovado em: 13 de dezembro de 2019**



**Dr<sup>a</sup> Vera Maria Melchiors Morsch (UFSM)**  
**(Presidente/ Orientadora)**



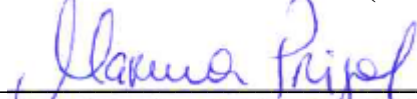
**Dr<sup>a</sup> Cinthia Melazzo de Andrade (UFSM)**



**Dr<sup>a</sup> Francieli Moro Stefanello (UFPeI)**



**Dr<sup>a</sup> Maribel Antonello Rubin (UFSM)**



**Dr<sup>a</sup> Marina Prigol (UNIPAMPA)**

Santa Maria, RS  
2019

*Dedico esta tese especialmente aos meus pais, **Paulo e Mara**, minha irmã **Andreza** e meu namorado **Sandor**, que sempre me incentivaram e torceram por mim, dando-me amor, carinho e apoio.*

## AGRADECIMENTOS

Serei sempre grata a todas as pessoas que fizeram parte de minha trajetória na UFSM, especialmente neste querido laboratório Enzitox, onde comecei na iniciação científica no ano de 2009 e permaneci até a conclusão deste doutorado. Acredito que sem a amizade, o carinho e o apoio de cada pessoa que convivi não teria conquistado meus objetivos.

Agradeço a Deus, por guiar minhas decisões, iluminar meu caminho e ter me proporcionado momentos maravilhosos.

Aos meus pais Paulo e Mara, que muitas vezes abriram mão dos seus próprios sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Obrigada por proporcionarem meu estudo, pelo incentivo e preocupação. Agradeço pelo amor, dedicação e bons exemplos. Amo vocês!

À minha irmã Andreza, que sempre esteve ao meu lado nos momentos alegres e tristes. Obrigada pela cumplicidade, confiança e palavras de carinho. Amo você!

Ao meu namorado Sandor, agradeço a sua paciência, compreensão e incentivo. Obrigada por ser esta pessoa maravilhosa, pelo seu amor e carinho em todos esses anos ao meu lado, esta conquista também é sua. Te amo!

Aos meus sogros, Walmyr e Nadir, que sempre me trataram como filha. Obrigada pelo apoio, zelo e todo carinho que dedicaram a mim.

Agradeço à minha orientadora Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Vera M. Morsch, obrigada por me orientar, incentivar e contribuir na minha vida acadêmica sempre com dedicação e bom humor. Agradeço pela paciência e confiança em mim depositada. Você é um exemplo de mulher e profissional, que levarei para a vida. Sou muito grata.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Rosa Chitolina Schetinger, por todo carinho, dedicação e ensinamentos. Muito obrigada por abrir as portas deste laboratório e me incentivar na pesquisa.

Aos meus querido amigos, colegas e colaboradores Nathieli, Charles, Naiara, Vanessa, Aniélen, Karine, Thauan, Thalison, Milagros, Vitor, Luana, Diéssica, Letícia, Angélica, Jessié, Fabiano, Loren, Carol, Gisele, Jamile. Obrigada pela amizade, carinho e pela ajuda incansável nos experimentos. Agradeço pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos, vocês fazem parte desta conquista.

Às amigas do apartamento 310, Maiara, Natália, Juci e Chaiane, obrigada pela amizade, carinho e por serem como uma família para mim.

Aos professores membros desta banca, obrigada pela disponibilidade em avaliar este trabalho e pelas contribuições que foram fundamentais para o aprimoramento do mesmo.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica, pela oportunidade de realização deste curso e disponibilização de todos os equipamentos. E seus professores e funcionários pelos ensinamentos e assistência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos recursos financeiros concedidos.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram na elaboração deste trabalho, sendo na realização das técnicas, na troca de ideias, ou torcendo por mim.

*"Nada do que foi será  
De novo do jeito que já foi um dia  
Tudo passa, tudo sempre passará*

*A vida vem em ondas, como um mar  
Num indo e vindo infinito*

*Tudo o que se vê não é  
Igual ao que a gente viu há um segundo  
Tudo muda o tempo todo no mundo*

*Não adianta fugir  
Nem mentir pra si mesmo agora  
Há tanta vida lá fora  
Aqui dentro, sempre  
Como uma onda no mar...*

(LULU SANTOS)



## RESUMO

### NEUROPROTEÇÃO DO CASSIS (*Ribes nigrum* L.) E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM O DONEPEZIL EM MODELO DE AMNÉSIA INDUZIDA POR ESCOPOLAMINA

AUTORA: Pauline da Costa

ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Maria Melchiors Morsch

Os déficits de memória que ocorrem com o processo de envelhecimento também podem estar associados com a fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (DA). A DA caracteriza-se pela deterioração progressiva da memória e de outras funções cognitivas, que podem apresentar múltiplos fatores, como o comprometimento da neurotransmissão colinérgica e o excesso de espécies reativas no sistema nervoso central. Além disso, tem sido proposto o envolvimento do sistema purinérgico em diversos processos patológicos como a neurodegeneração. Fármacos inibidores das colinesterases, como o Donepezil (DNPZ), são utilizados no tratamento dos sintomas da DA, contudo, estes apresentam efeitos adversos. O cassis (*Ribes nigrum* L.) é um fruto com alto teor de compostos bioativos principalmente as antocianinas cianidina e delphinidina, com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e neuroprotetoras. Considerando o exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos neuroprotetores do cassis e de sua associação com o DNPZ sobre o comprometimento cognitivo, a sinalização colinérgica e purinérgica, bem como analisar as respostas anti-inflamatórias e antioxidantes em modelo de amnésia induzida pela administração crônica de escopolamina em camundongos. Camundongos adultos Swiss machos receberam previamente cassis (50 ou 100 mg/kg) ou salina (10 mL/kg) por via oral, uma vez por dia, durante 7 dias. Posteriormente, além do cassis, iniciou-se a administração de DNPZ (5 mg/kg; via oral) e escopolamina (SCO; 1 mg/kg; via i.p.), uma vez ao dia, por mais 21 dias. A SCO foi administrada trinta minutos após o cassis e o DNPZ, para a indução do modelo de amnésia, devido seu efeito antagonista dos receptores muscarínicos da acetilcolina. Esse modelo foi validado pelos testes comportamentais: labirinto em Y, campo aberto, reconhecimento de objetos, labirinto aquático de Morris e esQUIVA inibitória. O protocolo experimental teve duração total de 28 dias. Os resultados dos testes comportamentais demonstraram que o tratamento com cassis e/ou DNPZ preveniu os déficits de aprendizado e memória induzidos por SCO. Esse modelo causou prejuízos ao sistema colinérgico, aumentando a atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase, além de reduzir a expressão da colina acetiltransferase em hipocampo, e aumentar a expressão e a densidade da AChE em córtex cerebral e hipocampo de camundongos. Contudo, o tratamento com cassis e/ou DNPZ preveniu esses efeitos deletérios às enzimas colinérgicas. Além disso, o tratamento com cassis e/ou DNPZ preveniu a diminuição na atividade da NTPDase (ATP e ADP) e o aumento da atividade da adenosina desaminase em sinaptossomas de córtex cerebral, bem como preveniu o aumento da densidade dos receptores P2X7 e A2A em córtex cerebral de camundongos com danos cognitivos induzidos por SCO. O tratamento com cassis e/ou DNPZ também evitou as respostas pró-inflamatórias induzidas por SCO, com a redução da expressão dos marcadores inflamatórios inflamassoma *Nod-like receptor protein 3* (NLRP3) e interleucina-1 $\beta$  em córtex cerebral. Ainda, o cassis e/ou DNPZ promoveram efeitos antioxidantes, inibindo os efeitos da SCO sobre a glutatona redutase, a glutatona S-transferase, a glutatona peroxidase e os tióis não-proteicos, além de reduzirem os parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebrale/ou hipocampo. Os resultados obtidos nesse estudo foram semelhantes aos encontrados no tratamento com o medicamento padrão DNPZ. Com base nisso, sugere-se que cassis e/ou DNPZ exerceram efeitos anti-amnésicos através da modulação do sistema colinérgico e purinérgico, prevenindo as respostas pró-inflamatórias e o estresse oxidativo. Portanto, o cassis pode ser considerado um promissor agentes terapêuticos na prevenção dos déficits de memória.

**Palavras-chave:** Alzheimer, Antioxidante, Antocianinas, Colinesterases, Neuroinflamação, Sistema purinérgico.

## ABSTRACT

### NEUROPROTECTION OF BLACKCURRANT (*Ribes nigrum* L.) AND ITS ASSOCIATION WITH DONEPEZIL IN A SCOPOLAMINE-INDUCED AMNESIA MODEL

AUTORA: Pauline da Costa

ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Maria Melchioris Morsch

Memory deficits that occur with the process of aging could also be associated with the pathophysiology of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD). AD is characterized by the progressive deterioration of memory and other cognitive functions, which could present multiple factors, such as the impairment of cholinergic neurotransmission and the excess of reactive species in the central nervous system. Besides, it has been proposed the involvement of the purinergic system in several pathological processes as neurodegeneration. Cholinesterase inhibitor drugs, such as Donepezil (DNPZ), are used in the treatment of AD symptoms; however, they could present adverse effects. Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) is a fruit with a high content of bioactive compounds mainly anthocyanins such as cyanidin and delphinidin, with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective properties. The objective of this study was to evaluate the neuroprotective effects of Blackcurrant and of its association with DNPZ on the cognitive impairment, cholinergic and purinergic signaling, as well as to analyze the anti-inflammatory and antioxidant responses in an amnesia model induced by the chronic administration of scopolamine in mice. Male adult Swiss mice previously received Blackcurrant (50 or 100 mg/kg) or saline (10 mL/kg), orally, once a day for 7 days. Posteriorly, in addition to Blackcurrant, DNPZ (5 mg/kg; orally) and Scopolamine (SCO; 1 mg/kg, i.p.) were administered once a day for a further 21 days. SCO was administered thirty minutes after Blackcurrant and DNPZ to induce amnesia model, due to its antagonist effect on acetylcholine muscarinic receptors. This model was validated by behavior tests: Y-maze, open field, object recognition, Morris water maze and inhibitory avoidance. The experimental protocol had a total duration of 28 days. Results of behavioral tests showed that the treatment with Blackcurrant and/or prevented learning and memory deficits induced by SCO. This model caused damages to the cholinergic system, increasing the activity of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase enzymes, besides reducing the expression of choline acetyltransferase in the hippocampus, and increasing AChE expression and density in the cerebral cortex and hippocampus of mice. However, the treatment with Blackcurrant and/or DNPZ prevented these deleterious effects to cholinergic enzymes. Additionally, the treatment with Blackcurrant and/or DNPZ prevented the decrease in the NTPDase activity (ATP and ADP) and the increase in the activity of adenosine deaminase in synaptosomes of cerebral cortex, as well as decreasing the density of P2X7 and A2A receptors in the cerebral cortex of mice with cognitive damages induced by SCO. The treatment with Blackcurrant and/or DNPZ also avoided the pro-inflammatory responses induced by SCO, reducing the expression of the inflammatory markers such as *Nod-like receptor protein 3* (NLRP3) inflammasome and interleukin-1 $\beta$  in the cerebral cortex. Furthermore, Blackcurrant and/or DNPZ promoted antioxidant effects, inhibiting SCO effects on the glutathione system and decreasing oxidative stress parameters in the cerebral cortex and/or hippocampus. The results of this study were similar to the found with treatment with the standard drug DNPZ. Based on the results, it is suggested that Blackcurrant and/or DNPZ exerted anti-amnesic effects by the modulation of cholinergic and purinergic system, preventing the pro-inflammatory responses and oxidative stress. Therefore, Blackcurrant could be considered as promising therapeutic agent in the prevention of memory deficits.

**Keywords:** Alzheimer, Antioxidant, Anthocyanins, Cholinesterases, Neuroinflammation, Purinergic system.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1.** Esquema representativo de um protocolo comportamental e as interferências que podem ocorrer nas fases do processo de memória.....21
- Figura 2.** Classificação da memória e exemplos de testes comportamentais.....24
- Figura 3.** Representação de uma sinapse colinérgica, ilustrando a síntese, armazenamento, transporte e degradação da ACh, e os diferentes subtipos de receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos.....26
- Figura 4.** Representação esquemática da interação da ACh com o sítio ativo da AChE.....28
- Figura 5.** Estrutura esquemática dos sítios ativos das enzimas AChE (A) e BChE (B).....30
- Figura 6.** Representação esquemática da cascata de ativação do inflamassoma NLRP3 e maturação da citocinas pró-inflamatórias.....34
- Figura 7.** Visão geral da sinalização purinérgica.....37
- Figura 8.** Esquema representando a geração de algumas ERO ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  e  $OH^{\cdot}$ ) e ERN ( $NO^{\cdot}$  e  $ONOO^{\cdot-}$ ) e os possíveis danos que elas podem causar aos lipídios, proteínas, DNA e RNA. Além das enzimas de defesa antioxidante endógenas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPX), glutatona redutase (GR) e glutatona S-transferase (GST) que neutralizam e detoxificam estas espécies reativas e xenobióticos.....40
- Figura 9.** Dinâmica dos biomarcadores na cascata patológica da doença de Alzheimer. Os biomarcadores mudam de normais para extremamente anormais (Eixo Y) em função dos estágios clínicos da doença: pré-clínico, comprometimento cognitivo leve (CCL) e demência (EixoX).....44
- Figura 10.** Representação esquemática da patogênese da DA, baseada na disfunção colinérgica, acúmulo de peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $\beta A$ ) e formação de placas amiloides, além da hiperfosforilação da proteína *tau* e depósito de emaranhados neurofibrilares.....45
- Figura 11.** Estrutura química da escopolamina, alcaloide obtido das plantas da família das Solanaceae.....47
- Figura 12.** Estrutura do fármaco donepezil, com as subunidades N-benzilpiperidina (VERMELHO) e indanona (AZUL) .....51
- Figura 13.** Fotografias do cassis (*Ribes nigrum L.*) mostrando os arbustos sem frutos (A e B) e com frutos (C) e os frutos isolados (D).....55
- Figura 14.** Estrutura das quatro principais antocianinas encontradas no cassis.....57
- Figura 15.** Uma visão geral dos efeitos terapêuticos e mecanismos protetores do cassis em vários órgãos..... 58

## MANUSCRITO I

**Figure 1.** Experimental schedule.....92

**Figure 2.** Effect of Blackcurrant (50 mg/kg) and/or Donepezil (5 mg/kg) on spatial memory impairment induced by Scopolamine (1 mg/kg) in mice. The performance was assessed by alternation percentage in Y-Maze task. Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \*\*\*\*  $P < 0.0001$  indicates a significant difference from the control/saline group. #  $P < 0.05$  and ###  $P < 0.001$  indicates a significant difference from the Scopolamine/saline group. Bars represent mean  $\pm$  SEM (n=8-11).....92

**Figure 3.** Effect of Blackcurrant (50 mg/kg) and/or Donepezil (5 mg/kg) on Scopolamine-induced spatial memory impairment in mice (1 mg/kg) after the object recognition test. (A) Training session, (B) Short-term memory (test assessed 4 h after training) and (C) Long-term memory (test assessed 24 h after training). Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \*  $P < 0.05$  indicates a significant difference from the control/saline group. #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  and ###  $P < 0.001$  indicates a significant difference from the Scopolamine/saline group. Bars represent mean  $\pm$  SEM (n=8-11).....93

**Figure 4.** Effect of Blackcurrant (50 mg/kg) and Donepezil (5 mg/kg) treatment on aversive memory in the inhibitory avoidance test in Scopolamine-induced mice (1 mg/kg). (A) Step-down latency training and (B) Step-down latency test assessed 24 h after training. Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \*  $P < 0.05$  indicates a significant difference from the control/saline group. #  $P < 0.05$  indicates a significant difference from the Scopolamine/saline group. Bars represent (A) mean  $\pm$  SEM and (B) median  $\pm$  interquartile range of training and test measures (n=5).....94

**Figure 5.** Effect of Blackcurrant (50 mg/kg) and/or Donepezil (5 mg/kg) on acetylcholinesterase (AChE) activity in cerebral cortex (A) and hippocampus (B), and butyrylcholinesterase (BChE) activity in cerebral cortex (C) and hippocampus (D) in Scopolamine-induced amnesia (1 mg/kg) in mice. Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$  indicates a significant difference from the control/saline group. #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  and ###  $P < 0.001$  indicates a significant difference from the Scopolamine/saline group. Bars represent mean  $\pm$  SEM (n=5-7).....95

**Figure 6.** Relative mRNA expression pattern of acetylcholinesterase (AChE) enzyme gene in cerebral cortex (A) and hippocampus (B), and choline acetyltransferase (ChAT) enzyme gene in cerebral cortex (C) and hippocampus (D) of mice treated with Blackcurrant (50 mg/kg) and/or Donepezil (5 mg/kg) in Scopolamine-induced amnesia (1 mg/kg) in mice. Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$  indicates a significant difference from the control/saline group. #  $P < 0.05$  and ##  $P < 0.01$  indicates a significant difference from the Scopolamine/saline group. Bars represent mean  $\pm$  SEM (n=3).....96

**Figure 7.** Representative and quantitative Western-blot analysis of the AChE density in cerebral cortex (A) and hippocampus (B) of mice treated with Blackcurrant (50 mg/kg) and/or Donepezil (5 mg/kg) in Scopolamine-induced. Equalization of protein loading was determined using actin as the house keeping protein. Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \*\*\* P < 0.001 and \*\*\*\* P < 0.0001 indicates a significant difference from the control/saline group. # P < 0.05, ## P < 0.01 and #### P < 0.0001 indicates a significant difference from the Scopolamine/saline group. Bars represent mean ± SEM (n=3-4).....97

## MANUSCRITO II

**Figure 1.** Schematic representation of the experimental protocol.....127

**Figure 2.** Effect of Blackcurrant (BC 50 or 100 mg/kg) and/or Donepezil (DNPZ 5 mg/kg) on spatial memory parameters in the probe trial of Morris Water Maze test in Scopolamine-induced (SCO 1 mg/kg) mice. (A) Number of crossings over the target quadrant. (B) Time spent in the target quadrant. (C) Time spent in the opposite quadrant. Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \* P < 0.05, \*\*\* P < 0.001 and \*\*\*\* P < 0.0001 indicates a significant difference from the control group. # P < 0.05 and ## P < 0.01 indicates a significant difference from the SCO group. Bars represent mean ± SEM (n=6-11).....128

**Figure 3.** Effect of Blackcurrant (BC 50 or 100 mg/kg) and/or Donepezil (DNPZ 5 mg/kg) on NTPDase activity, using ATP (A) and ADP (B) as substrate, 5'-nucleotidase activity using AMP (C) as substrate and adenosine deaminase (ADA) activity in synaptosomes of the cerebral cortex of Scopolamine-induced (SCO 1 mg/kg) mice. Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \* P < 0.05 and \*\* P < 0.01 indicates a significant difference from the control group. # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 and #### P < 0.0001 indicates a significant difference from the SCO group. Bars represent mean ± SEM (n=5-6).....129

**Figure 4.** P2X7 (A) and A2A (B) receptors densities by Western blot analysis in the cerebral cortex of Scopolamine-induced mice treated with (BC 50 or 100 mg/kg) and/or Donepezil (DNPZ 5 mg/kg). Actin loading control antibody was used to normalize the levels of protein. Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 and \*\*\*\* P < 0.0001 indicates a significant difference from the control/saline group. # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 and #### P < 0.0001 indicates a significant difference from the Scopolamine/saline group. Bars represent mean ± SEM (n=3-4).....130

**Figure 5.** Gene expression profile of NLRP3 inflammasome (A) and IL-1β (B) in the cerebral cortex of Scopolamine-induced mice treated with (BC 50 or 100 mg/kg) and/or Donepezil (DNPZ 5 mg/kg). Gene expression was normalized by β-actin (ACTB) and performed using qRT-PCR. Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \*\* P < 0.01 and \*\*\*\* P < 0.0001 indicates a significant difference from the control group. #### P < 0.0001 indicates a significant difference from the SCO group. Bars represent mean ± SEM (n=3).....131

**Figure 6.** Effect of Blackcurrant (BC 50 or 100 mg/kg) and/or Donepezil (DNPZ 5 mg/kg) on NOx (A), TBARS (B) and protein carbonyl (C) levels in cerebral cortex of Scopolamine-induced (SCO 1 mg/kg) mice. Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \* P < 0.05 and \*\* P < 0.01 indicates a significant difference from the control group. # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 and #### P < 0.0001 indicates a significant difference from the SCO group. Bars represent mean ± SEM (n=4-7).....132

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO I

<b>Table 1.</b> Primer sequences used for gene expression analysis.....	89
<b>Table 2.</b> Effect of Blackcurrant (50 mg/kg) and/or Donepezil (5 mg/kg) on spontaneous locomotor activity in the control groups or Scopolamine-induced (SCO; 1 mg/kg) mice.....	89
<b>Table 3.</b> Effect of Blackcurrant (50 mg/kg) and/or Donepezil (5 mg/kg) on intracellular reactive species (RS) and non-protein thiols (NPSH) levels, and on the activity of enzymes glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GPx) in the cerebral cortex of control groups or Scopolamine-induced (1 mg/kg; SCO) mice.....	90
<b>Table 4.</b> Effect of Blackcurrant (50 mg/kg) and/or Donepezil (5 mg/kg) on intracellular reactive species (RS) and non-protein thiols (NPSH) levels, and on the activity of enzymes glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GPx) in the hippocampus of control groups or Scopolamine-induced (1 mg/kg; SCO) mice.....	90
<b>Table 5.</b> F and P values of ANOVA of behavioral and biochemical parameters.....	91

### MANUSCRITO II

<b>Table 1.</b> Effect of Blackcurrant (BC 50 and 100 mg/kg) and/or Donepezil (DNPZ 5 mg/kg) treatments to Scopolamine-induced (SCO 1 mg/kg) mice on the latencies to reach the escape platform (expressed in seconds) over 3 days training session in the Morris Water Maze test.....	124
<b>Table 2.</b> Evaluation of Blackcurrant (BC 50 and 100 mg/kg) and/or Donepezil (DNPZ 5 mg/kg) treatment on spontaneous locomotor activity of Scopolamine-induced (SCO 1 mg/kg) mice using the Morris Water Maze test.....	125
<b>Table 3.</b> F and P values of ANOVA of behavioral and biochemical parameters.....	126

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

- A2AR** - receptor de ligação para adenosina
- $\alpha 4$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 2$**  – subunidades dos receptores ionotrópicos
- AC** - adenilato ciclase
- ACh** - acetilcolina
- AChE** - acetilcolinesterase
- ADA** - adenosina desaminase
- ADP** - adenosina difosfato
- AMP** - adenosina monofosfato
- ANOVA** - análise de variância
- ASC** - *apoptosis-associated speck-like containing a CARD domain*
- ATP** - adenosina trifosfato
- $\beta A$**  - proteína  $\beta$ -amiloide
- BChE** - butirilcolinesterase
- Ca<sup>2+</sup>** - íon cálcio
- CARD** - domínio de recrutamento de caspase (do inglês *caspase recruiting domain*)
- CAT** - catalase
- CCL** - comprometimento cognitivo leve
- ChAT** - colina acetiltransferase
- ChT** - transportador de colina (do inglês *choline transporter*)
- DA** - doença de Alzheimer
- ERO** - espécies reativas de oxigênio
- ERN** - espécies reativas de nitrogênio
- GPx** - glutational peroxidase
- GR** - glutational redutase
- GSH** - glutational reduzida
- GSK3** - glicogênio sintase cinase 3
- GSSH** - glutational oxidada
- GST** - glutational S - transferase
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - peróxido de hidrogênio
- IL - 1 $\beta$**  - interleucina -1 $\beta$
- IL - 18** - interleucina -18
- IP<sub>3</sub>** - inositol 1,4,5- trifosfato

**K<sup>+</sup>** - íon potássio

**LRR** - repetições ricas em leucina (do inglês *Leucine-rich repeat*)

**M1, M2, M3, M4, M5** - receptor muscarínico (1-5)

**MCD** - memória de curta duração

**MLD** - memória de longa duração

**MDA** - malondialdeído

**Na<sup>+</sup>** - íon sódio

**NADPH** - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

**NACHT** - domínio NOD de ligação ao nucleotídeo

**NLRP3** - receptor do tipo NOD com domínio proteína 3 (do inglês *Nod-like receptor protein 3*)

**NO<sup>•</sup>** - óxido nítrico

**NOD** - domínio de oligomerização nuclear (do inglês, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*)

**NOS** - óxido nítrico sintase

**NPSH** - tiois não-proteicos

**NTPDase** - nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

**ONOO<sup>-</sup>** - peroxinitrito

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** - ânion superóxido

**OH<sup>•</sup>** - íon hidroxila

**OMS/WHO** - Organização Mundial da Saúde/ World Health Organization

**P1** - família dos receptores purinérgicos de adenosina

**P2** - família dos receptores purinérgicos de nucleotídeos

**P2X** - receptor ionotrópico para ATP

**P2X7R** - receptor de ligação para ATP do tipo 7

**P2Y** - receptor metabotrópico de nucleotídeos

**Panx1** - hemicanal de panexina do tipo 1

**PAS** - sítio aniônico periférico (do inglês *peripheral anionic site*)

**PPA** - proteína precursora de amiloide

**PYD** - domínio pirina (do inglês *pyrin domain*)

**SNP** - sistema nervoso periférico

**SNC** - sistema nervoso central

**SOD** - superóxido dismutase

**Tau** - taurina

**VACHT** - transportador vesicular da ACh (do inglês *vesicular acetylcholine transporter*)



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
2.1 Memória .....	20
2.2 Sistema colinérgico .....	24
2.3 Sistema purinérgico .....	30
2.4 Envelhecimento e estresse oxidativo .....	38
2.5 Demência .....	41
2.6 Escopolamina .....	46
2.7 Donepezil .....	50
2.8 Compostos Naturais .....	64
2.8.1 Cassis ( <i>Ribes nigrum</i> L.) .....	54
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	60
3.1 Objetivo Geral .....	60
3.2 Objetivos Específicos .....	60
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>61</b>
4.1 Manuscrito I .....	61
4.2 Manuscrito II .....	98
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>134</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>142</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>144</b>
<b>ANEXO A</b> .....	<b>164</b>
<b>ANEXO B</b> .....	<b>165</b>

## APRESENTAÇÃO

Os resultados que compõem esta tese estão apresentados sob a forma de manuscritos submetidos à publicação em revistas internacionais, os quais se encontram nos itens Manuscrito I e Manuscrito II. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se nos próprios manuscritos e representam a íntegra deste estudo.

Os itens Discussão e Conclusões encontram-se no final desta tese e apresentam interpretações e comentários gerais sobre os manuscritos contidos neste trabalho.

As Referências referem-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução, Revisão bibliográfica e Discussão desta tese.

Os manuscritos estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas para o qual serão submetidos, e seguem abaixo:

1. Pauline da Costa, Maria Rosa C. Schetinger, Naiara Stefanello, Thauan F. Lopes, Karine P. Reichert, Charles E. Assmann, Jucimara Baldissarelli, Nathieli B. Bottari, Vanessa V. Miron, Angélica R. Casagrande, Jessié M. Gutierrez, Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Vera M. Morsch. **Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) improves cholinergic signaling and protects against scopolamine-induced memory impairment in mice.**
2. Pauline da Costa, Maria Rosa C. Schetinger, Naiara Stefanello, Charles E. Assmann, Jucimara Baldissarelli, Karine P. Reichert, Taís V. Palma, Nathieli B. Bottari, Thauan F. Lopes, Leticia T. Druzian, Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Vera M. Morsch. **Purine signaling changes and pro-inflammatory responses are prevented by Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) in a scopolamine-induced cognitive impairment model mice.**



## 1. INTRODUÇÃO

A memória é um processo cognitivo responsável pela aquisição, consolidação e evocação das informações adquiridas e nos particulariza como indivíduos (IZQUIERDO, 2011). Nos últimos anos, a expectativa de vida da população mundial tem aumentado gradativamente, porém, juntamente com o envelhecimento cresce a incidência de doenças neurodegenerativas que ocasionam danos a memória (WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO, 2015).

Dentre estas, a doença de Alzheimer (DA) destaca-se como a demência mais comum, representando cerca de 70% dos casos de demência em pessoas acima dos 65 anos, com uma estimativa de 82 milhões de casos para 2030, o que torna seu estudo uma das prioridades mundiais. O envelhecimento é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da DA (WHO, 2019). Os mecanismos pelos quais essa doença multifatorial promove a deterioração das funções cognitivas ainda não estão completamente elucidados, mas algumas características neuropatológicas incluem: placas senis compostas por peptídeos  $\beta$ -amiloides, desenvolvimento de emaranhados neurofibrilares intraneuronais, neuroinflamação, estresse oxidativo e perda neuronal em regiões corticais e hipocampus (KUMAR et al., 2015).

Além disso, estudos mostram que distúrbios no sistema colinérgico desempenham um papel importante na patogênese da demência (BARTUS, 2000). Acredita-se que alterações na atividade da enzima colina acetiltransferase, acetilcolinesterase e butirilcolinesterase levam a uma redução do conteúdo do neurotransmissor acetilcolina (ACh) na fenda sináptica, molécula com grande relevância na formação de memórias, o que induz a déficits nas funções cognitivas de pacientes com DA (GREIG; LAHIRI; SAMBAMURTI, 2002a; SINGH et al., 2013). Dessa forma, a escopolamina, um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos de ACh, vem sendo utilizada para induzir amnésia em modelos animais, pois promove um comprometimento da neurotransmissão colinérgica, causando um déficit de memória característico de demência, mimetizando assim, sintomas da DA (KLINKENBERG; BLOKLAND, 2010b).

Além de danos nos neurônios colinérgicos, há evidências de alterações na sinalização purinérgica associadas à progressão de doenças neurodegenerativas e aos efeitos deletérios induzidos pela escopolamina (KADDURAH-DAOUK et al., 2013). O sistema purinérgico é composto principalmente pelos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares de adenina, sendo a adenosina trifosfato (ATP) e a adenosina as moléculas sinalizadoras de maior relevância. O ATP é considerado um neurotransmissor capaz de modular a transmissão purinérgica ao se ligar

aos receptores do tipo P2, principalmente, ao subtipo P2X7 (P2X7R), que está amplamente expresso no sistema nervoso central (SNC) e é ativado por altos níveis de ATP (BURNSTOCK, 2006a). Estudos mostram que essa ativação do P2X7R pelo ATP pode resultar na ativação de complexos proteicos denominados inflamassomas, entre eles o receptor do tipo NOD com domínio proteína 3 (NLRP3 - do inglês, *Nod-like receptor protein 3*), que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), ambos os marcadores inflamatórios estão mais expressos em cérebro de pacientes com DA (WEI et al., 2019; WOODS et al., 2016). A adenosina exerce seus efeitos neuroprotetores e neuromoduladores através dos receptores de superfície celular P1, dentre eles o receptor A2A (A2AR) (BURNSTOCK, 2006b). Conforme alguns estudos, alterações na expressão de P2X7R e A2AR contribuem para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (BAGATINI et al., 2018). Após exercerem seus efeitos, os nucleotídeos e nucleosídeos são rapidamente inativados pelas enzimas NTPDase (Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase), 5'- nucleotidase e adenosina desaminase (ADA), as quais são responsáveis por controlar os níveis extracelulares destas moléculas sinalizadoras (FÜRSTENAU et al., 2006).

Muitas evidências experimentais também correlacionam os déficits na memória e aprendizagem que ocorrem no envelhecimento e na DA ao estresse oxidativo (ZHU et al., 2007). O acúmulo de espécies reativas e a redução dos processos que neutralizam essas moléculas causam alterações na sinalização redox normal das células. Conseqüentemente, muitos estudos mostraram que o estresse oxidativo promove um aumento na oxidação de proteínas, danos à membrana lipídica, oxidação de DNA e RNA, bem como a redução de defesas antioxidantes, o que leva à morte apoptótica de neurônios na DA (BUTTERFIELD; PERLUIGI; SULTANA, 2006).

Atualmente, ainda não há um tratamento capaz de curar a deterioração cognitiva encontrada na DA. Um dos fármacos padrão utilizado no tratamento dessa doença é o Donepezil, que inibe a ação da acetilcolinesterase, reduzindo a hidrólise da ACh e aumentando a disponibilidade desse neurotransmissor na fenda sináptica (COURTNEY et al., 2004). Porém, o tratamento farmacológico é sintomático e apresenta certas limitações de eficácia, tolerância, e efeitos adversos (FILLIT et al., 2006).

Por outro lado, estudos vêm buscando encontrar compostos neuroprotetores, que possuam a capacidade de prevenir ou amenizar os efeitos causados pelas doenças neurodegenerativas cerebrais (BOTTON et al., 2010; GUTIERRES et al., 2014a; TUNG; HAI; THU, 2017). Dentre estes, podemos destacar o cassis (*Ribes nigrum* L), conhecido no Brasil também por blackcurrant ou groselha-negra, muito utilizado em cosméticos, perfumes, extratos

e produtos alimentícios em geral. O consumo de cassis tem demonstrado induzir efeitos benéficos à saúde, os quais são atribuídos ao seu alto conteúdo de flavonoides como as antocianinas, cianidina e delphinidina, pigmentos abundantes nos frutos do cassis, com ação antioxidante e neuroprotetora (GOPALAN et al., 2012; KARJALAINEN et al., 2009; MEDINA DOS SANTOS et al., 2019). Esses fitonutrientes possuem elevada capacidade de neutralizar espécies reativas, além de reduzir a peroxidação lipídica e melhorar a atividade de enzimas antioxidantes em modelo animal de Alzheimer (JIA et al., 2012b; SHIH et al., 2010). Além disso, estudos anteriores revelaram que as antocianinas também têm a capacidade de modular as atividades das enzimas tanto do sistema purinérgico como do colinérgico em modelos de déficit de memória (GUTIERRES et al., 2012, 2014b).

Neste contexto, considerando que o cassis possui altos teores de moléculas biologicamente ativas com inúmeras propriedades benéficas, podendo ser suplementado na dieta, e em virtude da elevada incidência de doenças neurodegenerativas como a DA na população mundial, torna-se relevante investigar as propriedades neuroprotetoras, antioxidantes e anti-inflamatórias do cassis, compará-las ao medicamento padrão Donepezil e verificar os efeitos da associação de ambos os tratamentos sobre os parâmetros de memória, na modulação das sinalizações colinérgica e purinérgica em modelo de amnésia induzida por escopolamina em camundongos, afim de buscar alternativas naturais que auxiliem na prevenção e tratamento de déficits de memória.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

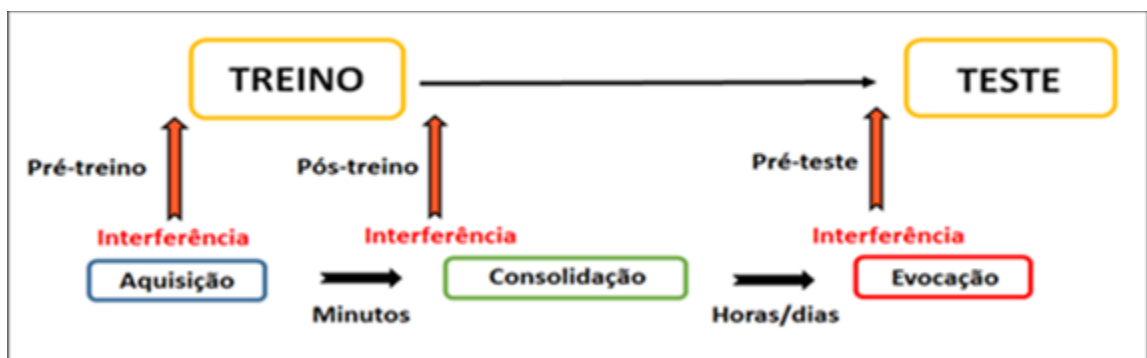
### **2.1 MEMÓRIA**

A memória é uma função cognitiva básica do SNC, que nos caracteriza como um indivíduo particular, pois a personalidade e o senso histórico são formados a partir de um conjunto de memórias, bem como de características comportamentais e genéticas únicas de cada indivíduo (IZQUIERDO, 2011). Contudo, as memórias não são armazenadas de forma imediata, há um processamento em diferentes regiões cerebrais, tais como hipocampo e áreas corticais aferentes e eferentes que regulam de forma integrada as novas informações, tornando-as permanentes (IZQUIERDO; MEDINA, 1997). Esse processo cognitivo é caracterizado pela aquisição, consolidação e evocação das informações adquiridas através de experiências, tornando os indivíduos capazes de se adaptarem e sobreviverem ao ambiente (IZQUIERDO, 2011; PONTES; DE SOUSA, 2016).

A aquisição, também conhecida como aprendizagem, é a fase em que o indivíduo é exposto a experiências ou estímulos, sendo novas informações aprendidas e convertidas em memória. Após ocorre a fase de consolidação, na qual ocorrem alterações celulares distintas, como a expressão de genes e a síntese de proteínas (MCGAUGH, 2000), a fim de reter e armazenar as informações recém adquiridas. Essas informações, que são inicialmente lábeis, isto é, instáveis, tornam-se mais estáveis para a retenção (ABEL; LATTAL, 2001; NADEL et al., 2012). Já a evocação ou recordação, é a fase que a informação consolidada está apta a ser lembrada, sendo acessada de forma consciente durante uma reexposição ao contexto de aprendizagem, com ou sem estímulos, e utilizada para exercer ou modificar um comportamento, e também no reconhecimento de pessoas, lugares, entre outros (ABEL; LATTAL, 2001).

Contudo, as informações podem ser alteradas nos primeiros minutos ou horas após sua aquisição, uma vez que o aprendizado está sujeito a intervenções por diferentes meios, como outras memórias, drogas ou tratamentos farmacológicos (ABEL; LATTAL, 2001; MCGAUGH; IZQUIERDO, 2000). Essas interferências podem ocorrer anteriormente à exposição a uma nova experiência, ou no início da aquisição, assim em um estudo sobre os efeitos de drogas utilizando um teste comportamental, essa interferência ocorreria antes do treino (pré-treino). Na consolidação ocorre um processo de estabilização, mas as memórias ainda estão susceptíveis a interferências, as quais ocorreriam após o treino (pós-treino). Na evocação pode ocorrer interferência com a aplicação de um tratamento antes do teste (pré-teste) (Figura 1), porém, após a consolidação, a memória fica menos sensível a interferências (MCGAUGH, 2000; NADER; HARDT, 2009).

**Figura 1** - Esquema representativo de um protocolo comportamental e as interferências que podem ocorrer nas fases do processo de memória.



Fonte: Adaptado de QUILLFELDT, 2016

As memórias podem ser classificadas de acordo com diferentes critérios, como conteúdo, tempo de duração, função ou natureza. De acordo com o tempo que permanecem disponíveis para a evocação após serem adquiridas, as memórias podem ser consideradas como de trabalho, as quais estão correlacionadas com as funções executivas, permitindo ao indivíduo tomar decisões e realizar as ações presentes no cotidiano (BADDELEY, 2012). Essas informações são armazenadas por um período muito curto de tempo (segundos a minutos). A memória de trabalho é uma função importante para os processos cognitivos complexos como compreensão, raciocínio e aprendizagem (IZQUIERDO et al., 2013).

Além disso, as memórias podem ser de curta duração (MCD), que são armazenadas por um período limitado de tempo (minutos a horas), e de longa duração (MLD), que persistem por um tempo maior (muitas horas, dias ou anos), ou por uma vida inteira (memória remota) (IZQUIERDO et al., 2013; QUILLFELDT, 2016). Apesar de partilharem diversos mecanismos, a MCD e MLD possuem características próprias, sendo dois processos relacionados que ocorrem simultaneamente, porém são independentes. Assim, a MCD não é a fase inicial da MLD (IZQUIERDO et al., 1999).

Quanto ao conteúdo, as memórias podem ser declarativas (explícitas) e não declarativas (implícitas). As memórias declarativas registram eventos ou conhecimentos adquiridos, que podem ser evocados conscientemente e facilmente descritos (IZQUIERDO et al., 2013; QUILLFELDT, 2016). As memórias declarativas envolvem principalmente o hipocampo e o córtex entorrinal, e são subdivididas em episódicas ou semânticas (CAHILL; MCGAUGH, 1998).

As memórias episódicas são referentes a eventos que participamos ou que assistimos, estando relacionadas a lembranças do indivíduo, cujo contexto espacial e temporal são específicos. E as memórias semânticas referem-se a conhecimentos gerais, como saber idiomas, bioquímica ou a cor do céu, independem do contexto espacial ou temporal em que foram adquiridos (AMEEN-ALI; EASTON; EACOTT, 2015; SQUIRE; STARK; CLARK, 2004). A memória episódica é particularmente vulnerável ao envelhecimento e à demência (HAIDER; TABASSUM; PERVEEN, 2016).

Em roedores, a memória espacial é considerada análoga à memória declarativa episódica dos seres humanos (BURGESS; MAGUIRE; O'KEEFE, 2002). A memória espacial possibilita ao animal localizar-se no tempo e espaço mediante as habilidades de codificar, armazenar e recuperar informações sobre o ambiente (ROSENBAUM et al., 2012). Esse tipo de memória é importante, pois permite a integração do animal com o ambiente que o cerca em relação a busca por alimento e água, no aprendizado de novos caminhos e na lembrança da



presença de objetos, de outros animais ou predadores (HELENE; XAVIER, 2006). O funcionamento normal dessa memória permite que o animal consiga explorar o ambiente, sem retornar a locais previamente explorados, evitando desperdiçar tempo nessas atividades (SANDERSON; BANNERMAN, 2012).

Denominam-se memórias implícitas ou procedurais as aptidões sensoriais e motoras, também conhecidas por hábitos, ou seja, são adquiridas através de prática e repetições, sendo evocadas de forma inconsciente e mais facilmente demonstradas que descritas, como andar de bicicleta, nadar e dirigir. Esse tipo de memória tem pouca probabilidade de esquecimento, sendo menos suscetíveis a modulações do que as memórias declarativas (IZQUIERDO, 2011; SQUIRE; DEDE, 2015).

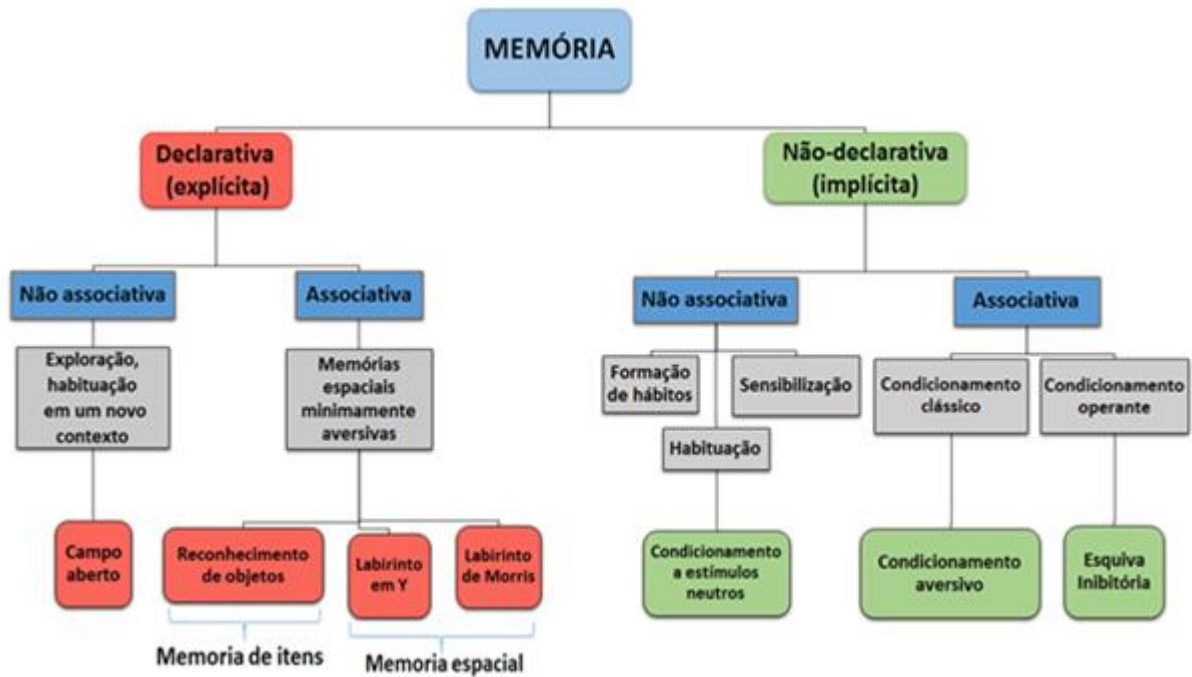
Outra classificação poder ser feita a partir da natureza da memória, sendo ela associativa ou não-associativa. As memórias associativas são originadas quando há ligação entre um estímulo e uma resposta ou entre dois estímulos. E não-associativas, quando associa-se um estímulo com a ausência do outro, também conhecido por habituação, estímulos repetitivos inicialmente neutros, importantes para a interação do organismo com o ambiente (IZQUIERDO et al., 2013). Podemos estudar memórias associativas e não associativas utilizando modelos animais em diversas metodologias (QUILLFELDT, 2016).

Existem duas principais categorias de memória implícita associativa, o condicionamento clássico e o condicionamento operante. No clássico, há associação entre estímulos e respostas involuntárias, emocionais e fisiológicas, que são controladas pelo experimentador. Os estímulos neutros (o som de um sino) podem ser transformados em estímulos condicionados, produzindo uma resposta condicionada (salivação). O condicionamento operante é arranjado para permitir uma determinada resposta, sendo usados reforços positivos (recompensa) ou punição (choque) para estimular ou inibir um comportamento, assim há uma associação entre o comportamento e as consequências para esse comportamento (QUILLFELDT, 2016).

Assim, a memória é um processo altamente dinâmico e complexo que causa alterações estruturais no sistema nervoso e depende da integralidade e da interação das diferentes regiões do encéfalo e dos sistemas de neurotransmissão, que contribuem de forma não idêntica (IZQUIERDO; MEDINA, 1997). Estudos têm demonstrado que os mecanismos essenciais da memória humana são bastante semelhantes à de outros mamíferos, como roedores (BURGESS; MAGUIRE; O'KEEFE, 2002; IZQUIERDO, 2011). Assim, no intuito de avaliar a memória desses animais, diversos testes comportamentais são aplicados, tais como o labirinto em Y, o reconhecimento de objetos, a esQUIVA inibitória e o labirinto aquático de Morris, dependendo

do tipo de memória a ser estudada. Esses testes vêm sendo muito utilizados em pesquisas de intervenções farmacológicas e na validação de comprometimentos cognitivos (BOTTON et al., 2010; CAN et al., 2018; PAGNUSSAT et al., 2015; QIU et al., 2016) (Figura 2).

**Figura 2** - Classificação da memória e exemplos de testes comportamentais.



Fonte: Adaptado de QUILLFELDT, 2016

## 2.2 SISTEMA COLINÉRGICO

O envolvimento das vias colinérgicas na regulação de inúmeras funções vitais, incluindo os processos cognitivos, como a memória e a aprendizagem, está bem estabelecido na literatura (MESULAM et al., 2002). A acetilcolina (ACh) foi a primeira molécula identificada como neurotransmissor nas sinapses cerebrais e está amplamente difundida no SNC e sistema nervoso periférico (SNP). Essa molécula tem um papel importante nas regiões do cérebro relacionadas à memória, onde colabora com a aquisição e a evocação das informações (MCQUISTON, 2014).

A ACh é sintetizada no interior do citoplasma de neurônios colinérgicos pela enzima colina acetiltransferase (ChAT; EC 2.3.1.6), a partir da acetil-coenzima A (acetil-CoA), que transfere um grupo acetil para a colina. A ChAT é ativada quando há despolarização, influxo

de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e fosforilação de diversas proteínas cinases (DOBROSKY et al., 2000). Após sua síntese, a ACh é conduzida até as vesículas pré-sinápticas pelo transportador vesicular da ACh (do inglês, *vesicular acetylcholine transporter* - VACHT) onde fica armazenada até sua liberação (AMENTA; TAYEBATI, 2008; SOREQ; SEIDMAN, 2001) (Figura 3).

À medida que acontece a estimulação nervosa, os neurônios colinérgicos são despolarizados e ocorre a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , as vesículas contendo ACh se fundem com a membrana, desencadeando a liberação do seu conteúdo na fenda sináptica por exocitose. Depois de difundida na fenda sináptica, a ACh torna-se ativa, exercendo seus efeitos através da ligação com seus receptores específicos, do tipo muscarínico ou nicotínico (FUJII; TAKADA-TAKATORI; KAWASHIMA, 2008) (Figura 3).

Os receptores nicotínicos pertencem à família de receptores ionotrópicos, compostos por cinco subunidades conhecidas por  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  (MILLAR; GOTTI, 2009). Quando ativados adquirem a conformação de canal aberto permitindo a entrada de íons potássio ( $\text{K}^+$ ) e sódio ( $\text{Na}^+$ ), com consequente despolarização e excitação celular rápida. Esses receptores são expressos em diferentes tecidos, como nos músculos e em regiões do SNC, predominando nas sinapses ganglionares (COX et al., 2008) (Figura 3).

Os receptores muscarínicos, diferentemente dos nicotínicos, constituem a família dos receptores acoplados a proteína G, contendo sete domínios transmembrana. Até o momento cinco subtipos de receptores muscarínicos foram identificados (M1- M5), e diferem entre si no tipo de proteína G a qual se ligam e, conseqüentemente, no tipo de resposta intracelular que desencadeiam (GROLEAU et al., 2015). Os tipos M1, M3 e M5 são acoplados à proteína  $G_{\alpha q}$ , ativam a fosfolipase C e produzem uma resposta celular excitatória. Enquanto os tipos M2 e M4 são acoplados à proteína  $G_{\alpha i}$  e inibem a enzima adenilato ciclase, promovendo assim uma diminuição da excitabilidade celular (CONN; JONES; LINDSLEY, 2009). Esses subtipos de receptores também são encontrados nos terminais pré-sinápticos, os quais podem suprimir a liberação de ACh, inibindo a neurotransmissão colinérgica (JONES; BYUN; BUBSER, 2012) (Figura 3).

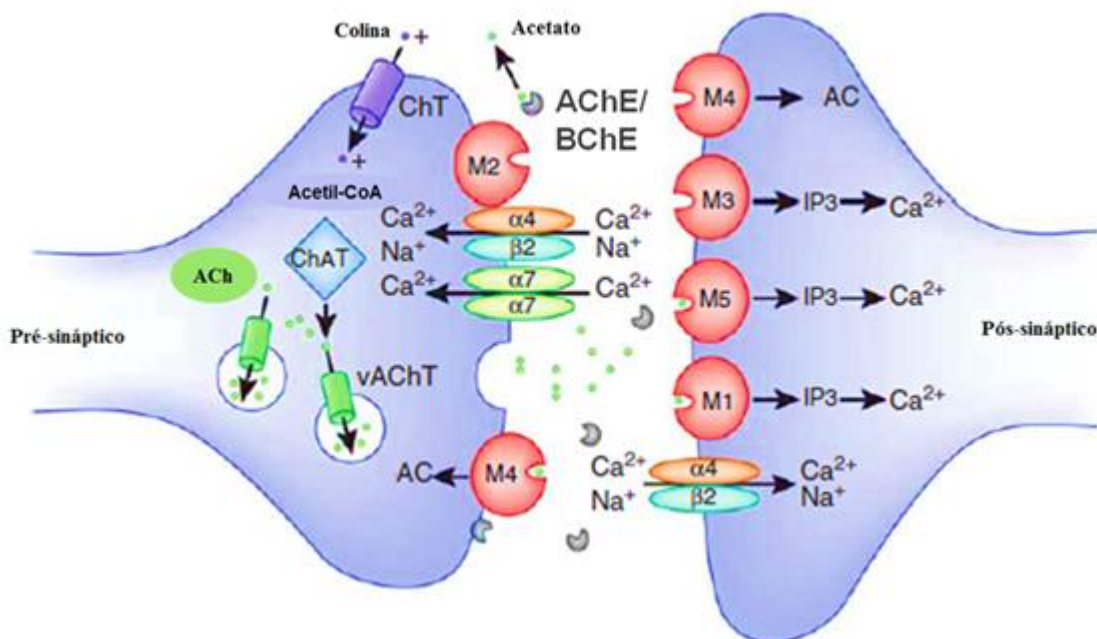
Além disso, os receptores muscarínicos são mais abundantes, funcionalmente predominantes, e a distribuição dos subtipos no SNC e SNP é heterogênea. No SNC, os subtipos M1 e M2 são expressos, principalmente, no córtex cerebral, hipocampo, substância negra e estriado, e estão envolvidos na regulação da memória e aprendizado (BROWN, 2010; VOLPICELLI; LEVEY, 2004). Estudos têm mostrado que agonistas muscarínicos facilitam o aprendizado e a memória (CONN; JONES; LINDSLEY, 2009; DERE; HUSTON; DE SOUZA SILVA, 2007). Em contrapartida, os antagonistas dos receptores muscarínicos, como a

escopolamina, prejudicam a memória (KLINKENBERG; BLOKLAND, 2010a; PARFITT et al., 2012).

A ação da ACh cessa quando ocorre sua hidrólise em acetato e colina pelas enzimas colinesterases. A colina é recaptada pelo transportador de colina para o terminal pré-sináptico e poderá ser reutilizada para formação de novas moléculas de ACh. A rápida desativação da ACh, impede seu acúmulo nas sinapses e evita a estimulação contínua por interações repetitivas com os receptores (SOREQ; SEIDMAN, 2001)

As colinesterases desempenham um papel muito importante na neurotransmissão colinérgica e estão envolvidas em diversas funções fisiológicas, pois encontram-se presentes em muitos tecidos, bem como no plasma e em outros fluidos corporais (COKUGRAS, 2003). São divididas em duas classes de acordo com a especificidade ao substrato, comportamento frente ao excesso de substrato e suscetibilidade a inibidores: a acetilcolinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7) ou colinesterase verdadeira, hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil como a ACh, e a butirilcolinesterase (BChE; E.C. 3.1.1.8), também conhecida como pseudocolinesterase ou colinesterase não-específica, hidrolisa preferencialmente butirilcolina, mas também tem ação sobre a ACh (COKUGRAS, 2003; WHITTAKER, 2010) (Figura 3).

**Figura 3.** Representação de uma sinapse colinérgica, ilustrando a síntese, armazenamento, transporte e degradação da acetilcolina, e os diferentes subtipos de receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos.



A AChE é uma enzima que pertence à classe das serino-hidrolases, atua na regulação da neurotransmissão colinérgica, uma vez que modula a concentração de ACh nas sinapses colinérgicas e nas junções neuromusculares (RANG et al., 2012). Essa glicoproteína é encontrada na forma globular ou assimétrica. A forma globular apresenta-se como monômeros (G1), dímeros (G2) e tetrâmeros (G4) de subunidades catalíticas em uma montagem homomérica. Essas podem ser solúveis ou ancoradas a membrana através de sequências de aminoácidos hidrofóbicos. A forma G4 está ligada à membrana da célula, sendo mais predominante no tecido nervoso e muscular, mas também pode ser encontrada no plasma (XIE et al., 2007). A forma assimétrica apresenta-se em uma montagem heteromérica, onde um (A4), dois (A8) e três (A12) tetrâmeros catalíticos estão ligados através de pontes dissulfeto a uma subunidade estrutural colagênica chamada Q (ColQ), sendo mais abundantes na junção neuromuscular (ALDUNATE et al., 2004).

O sítio ativo da AChE está localizado na parte inferior de um canal profundo e estreito, com cerca de 20 Å de profundidade, chamado “garganta aromática” (*gorge*), pois mais de 50% de seus aminoácidos são resíduos aromáticos conservados (Phe120, Phe288, Phe290, Phe330, Phe331, Trp84, Trp233, Trp279, Trp432, Tyr70, Tyr121, Try130, Try334 e Tyr442), os quais parecem ser importantes na orientação do substrato ao sítio ativo (XU et al., 2008).

Este sítio ativo é formado pelo sítio esteárico, no qual está localizado a tríade catalítica formada por serina (Ser203), histidina (His447) e glutamato (Glu334), onde aloja-se o grupamento éster e carbonil da ACh. A enzima também possui o sítio catalítico aniônico (Trp84, Glu199 e Phe330), ao qual a cadeia de nitrogênio quaternário da ACh carregada positivamente se liga, além das cavidades do oxianion (Gly118, Gly119 e Ala201) e do grupo acila (Phe288 e Phe290). Na superfície da "garganta aromática" existe um sítio aniônico periférico (PAS - *peripheral anionic site*; Asp72, Tyr70, Tyr121, Trp279 e Phe290) (HOUGHTON; REN; HOWES, 2006; ZHOU et al., 2008) (Figura 4).

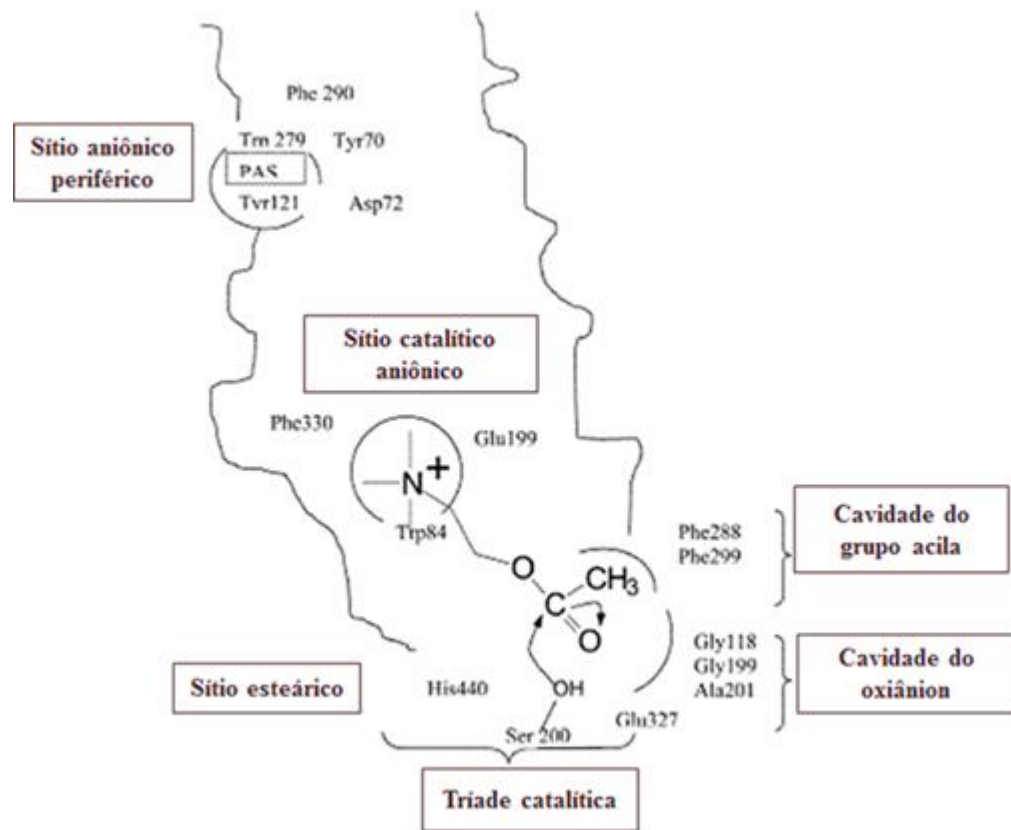
O mecanismo de ação da AChE na hidrólise da ACh envolve a ligação iônica a um resíduo de glutamato e a ligação do hidrogênio ao resíduo de tirosina, bem como o ataque nucleofílico da serina ao carbono da ACh e a catálise ácido/básica da histidina. Ao final, a AChE hidrolisa até  $6 \times 10^5$  moléculas de ACh a cada minuto, sendo considerada uma das enzimas mais eficientes (SILMAN; SUSSMAN, 2005, 2008).

A AChE é abundante no cérebro (10 vezes mais que a BChE), na junção neuromuscular e nos eritrócitos, e também está presente nos linfócitos e nas células endoteliais. Essa enzima pode ser considerada um marcador da função colinérgica, pois variações na sua atividade e

expressão podem indicar alterações na disponibilidade de ACh e dos seus receptores e, conseqüentemente, distúrbios no SNC (DA COSTA et al., 2017; POLACHINI et al., 2014).

Sabe-se que a intoxicação por inseticidas como os organofosforados causa a inibição irreversível da enzima, causando um acúmulo de ACh, o que leva a hiperatividade colinérgica, confusão mental, dor de cabeça, sono, distúrbios de memória, convulsão, estado epiléptico e até a morte. Entretanto, em pacientes com doenças neurodegenerativas, estudos mostram que a atividade da AChE está aumentada e o uso de inibidores da AChE têm sido bem evidenciado para tratamento desses distúrbios (PEPEU; GIOVANNINI, 2010).

**Figura 4.** Representação esquemática da interação da ACh com o sítio ativo da AChE.



Fonte: Adaptado de HOUGHTON; REN; HOWES, 2006.

Diferentemente da AChE, a distribuição neuronal da BChE é muito mais reduzida, contudo possui uma ampla distribuição no organismo, tendo uma maior atividade hepática, intestinal, cardíaca, renal e pulmonar, além de ser abundante no soro e no plasma (BARAI et al., 2018; COKUGRAS, 2003). As colinesterases também divergem na sensibilidade à inibição por organofosforados e excesso de substrato. A BChE é mais sensível a esse inseticida do que

a AChE, e atividade da BChE é aumentada com o excesso de substrato, enquanto a AChE é inibida (GREIG; LAHIRI; SAMBAMURTI, 2002b)

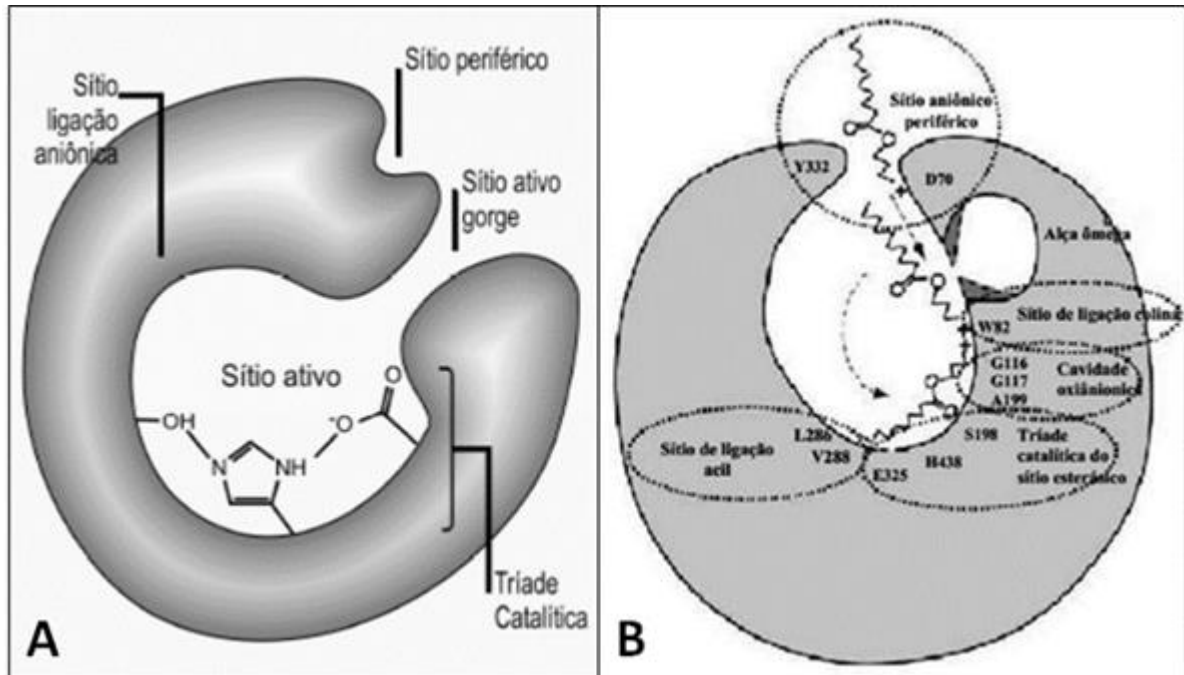
A BChE apresenta diversas formas moleculares, sendo elas identificadas por eletroforese de gel de amido, e denominadas de C1 a C5: monômero (C1), monômero ligado à albumina (C2), dímero (C3), tetrâmero (C4) e tetrâmero ligado a uma substância ainda não identificada (C5). A forma predominante e de maior atividade da BChE no soro é o tetrâmero, constituído por dois dímeros de subunidades idênticas (MASSON, 1989).

As enzimas possuem 65% de similaridade na sequência primária de aminoácidos e a estrutura da BChE é semelhante à da AChE, incluindo a tríade catalítica, o sítio catalítico aniônico e o PAS (PAN et al., 2008). Assim, o sítio ativo da BChE também está localizado no final de um canal profundo e estreito, na forma de garganta, composto por aproximadamente 55 aminoácidos. O volume desta garganta na BChE é maior que na AChE, devido a alguns resíduos de aminoácidos situados na entrada da garganta serem alifáticos e não aromáticos como encontrado na AChE, podendo ser este também um aspecto responsável pela diferença na seletividade das enzimas pelos substratos (SAXENA et al., 1999).

O PAS está localizado na entrada da garganta aromática e os seus resíduos de aspartato e tirosina (Asp70 e Tyr332) estão envolvidos na ligação inicial ao substrato carregado positivamente, o que controla a arquitetura funcional do sítio ativo. O Asp70 no PAS interage com o triptofano (Trp82) no sítio catalítico aniônico, formando uma alça ômega ( $\Omega$ ) um sub-sítio de ligação (MASSON et al., 2001). Ainda existem o sítio esteárico, formado pela tríade catalítica (Ser198, Glu325 e His438), as cavidades do grupo acila (Leu286 e Val288) e a oxianiónica (G116 e G117 e A199) localizada próxima ao sub-sítio de ligação (COKUGRAS, 2003; NICOLET et al., 2003) (Figura 5).

Estudos sugerem que a BChE pode co-regular a neurotransmissão colinérgica, substituindo ou colaborando com a ação da AChE na hidrólise da ACh nas junções neuromusculares (BARAI et al., 2018; COKUGRAS, 2003; DE CANDIA et al., 2017). A BChE tem um importante papel de desintoxicação de vários xenobióticos, além da ACh e da butirilcolina, também hidrolisa os relaxantes musculares succinilcolina e mivacúrio, ésteres alifáticos que não contêm colina, como o ácido acetilsalicílico, bem como muitas drogas como a cocaína e a procaína (COKUGRAS, 2003). Quando ocorre a inibição da AChE, a BChE impede os efeitos excitotóxicos induzidos pela hiperativação das vias colinérgicas. Além disso, existem evidências que atividade catalítica da BChE também está aumentada em condições neurodegenerativas (BARAI et al., 2018; DE CANDIA et al., 2017).

**Figura 5.** Estrutura esquemática dos sítios ativos das enzimas AChE (A) e BChE (B).



Fonte: Adaptado de SOREQ; SEIDMAN, 2001 (A) e COKUGRAS, 2003 (B)

### 2.3 SISTEMA PURINÉRGICO

O sistema purinérgico está notavelmente envolvido em muitos processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, neuromodulação, plasticidade e regeneração neuronal (ABBRACCHIO et al., 2009; BURNSTOCK, 2016). Os nucleotídeos, nucleosídeos, enzimas e receptores que constituem o sistema purinérgico atuam na sinalização em diferentes tecidos, desencadeando múltiplas respostas celulares, entre as quais estão a estimulação (ou inibição) da proliferação, migração e diferenciação, bem como a secreção de mediadores inflamatórios e a apoptose (DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017; FIELDS; BURNSTOCK, 2006). Além disso, a sinalização purinérgica está associada a condições patológicas, principalmente relacionados a neurodegeneração, como a DA, tornando assim relevante a investigação das vias e marcadores purinérgicos envolvidos nessa doença (BAGATINI et al., 2018; BURNSTOCK, 2006).

Os nucleotídeos de adenina, que compreendem a adenosina trifosfato (ATP), a adenosina difosfato (ADP) e a adenosina monofosfato (AMP), e seu derivado o nucleosídeo adenosina, são biomoléculas onipresentes, que podem atuar como coenzimas, moduladores alostéricos, intermediários energéticos e mensageiros intracelulares e extracelulares (DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017). O ATP é o nucleotídeo mais versátil e a principal fonte de



energia para funções celulares. Na década de 70, Geoffrey Burnstock apresentou a hipótese sobre o ATP estar envolvido na sinalização do sistema purinérgico, pois também atua como um neurotransmissor excitatório, o qual é armazenado em vesículas nas varicosidades nervosas e, após despolarização, liberado nas sinapses purinérgicas para agir sobre os seus receptores específicos na membrana pós-sináptica. Em muitas células, a liberação do ATP é um fator fisiológico ou está relacionada a uma resposta fisiopatológica ao estresse mecânico, a hipóxia, a inflamação ou a alguns agonistas (BURNSTOCK, 1976; 2008).

Além disso, o ATP foi reconhecido como um co-transmissor em ambos os SNP e SNC, sendo liberado nas sinapses juntamente com outros neurotransmissores como o glutamato e a ACh por exocitose ou por outros mecanismos, que incluem transportadores de ligação ao ATP, hemicanais de conexina ou panexina, canais aniônicos dependentes de voltagem ou purinoreceptores (ABBRACCHIO et al., 2009; BURNSTOCK, 2008; JUNGER, 2011).

Os nucleotídeos e nucleosídeos quando no meio extracelular desempenham seus efeitos pela interação com seus purinoreceptores específicos na superfície celular. Duas famílias de receptores purinérgicos foram identificadas, a P1, sensíveis a ação da adenosina; e os receptores P2, sensíveis ao ATP e ADP. Os receptores do tipo P2 são divididos em duas classes bem distintas, com base no mecanismo de ação, farmacologia e clonagem molecular, os receptores ionotrópico P2X e receptores metabotrópico P2Y. Esse último consiste em receptores acoplados à proteína G com oito subunidades identificadas (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14), que diferem entre si pela afinidade aos seus agonistas, alguns preferem pirimidinas (UTP e UDP) a purinas (ATP e ADP), e estão amplamente distribuídos nos neurônios e células gliais (WEISMAN et al., 2012; BURNSTOCK; KNIGHT, 2004).

Os receptores P2X são acoplados a canais iônicos, que quando ativados resultam na abertura de um poro na membrana celular permitindo a passagem dos cátions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$  (KHAKH; ALAN NORTH, 2006). Os receptores ionotrópicos também estão presentes nos terminais colinérgicos, sugerindo que estes receptores podem co-existir e interagir com os receptores nicotínicos no mesmo terminal, sendo capazes de induzir a liberação de ACh na fenda sináptica (DÍAZ-HERNÁNDEZ et al., 2002). A subfamília P2X possui sete subunidades identificadas (P2X1-7), as quais podem apresentar configurações homomérica ou heteromérica e estão amplamente distribuídas no SNC, tanto nos neurônios como nas células gliais, além de estarem presentes no músculo liso. Os receptores P2X2, P2X4 e P2X6 são mais expressos nos neurônios, além do P2X4 também estar presente na microglia. As subunidades P2X1 e P2X5 são expressas nas células de Schwann, enquanto os receptores heteroméricos P2X1/5 foram identificados em astrócitos corticais. Os receptores P2X7 (P2XR) são expressos de forma

heterogênea no SNC, sendo identificados em neurônios, astrócitos e micróglia (BURNSTOCK; KNIGHT, 2004; KOLES; FURST; ILLES, 2007; WOODS et al., 2016).

Entre os receptores P2X, o P2X7 destaca-se, pois quando ativado fornece uma importante via para o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  nos neurônios pós-sinápticos, desencadeando sinais citosólicos que regulam a liberação de neurotransmissores em diferentes neurônios (SPERLÁGH; ILLES, 2014). Além disso, o P2X7R tem o papel fundamental na regulação de respostas inflamatórias em vários processos fisiopatológicos, como a neuroinflamação mediada pela micróglia, que contribui para a progressão de danos neuronais em diferentes condições cerebrais nocivas (LISTER et al., 2007). A ativação do P2X7R estimula a formação e ativação do inflamassoma NLRP3 (do inglês, *Nod-like receptor protein 3*) o qual é responsável pela maturação das citocinas pró-inflamatórias como as interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-18 (IL-18), cujos níveis elevados têm sido observados no cérebro de pacientes e em modelos experimentais de DA (DI VIRGILIO, 2007; WOODS et al., 2016).

As altas concentrações de ATP no meio extracelular ( $> 0,1$  mM), como observados em condições inflamatórias, ativam o P2X7R, o que leva a abertura de canais de cátions não seletivos, induzindo a despolarização da membrana plasmática mitocondrial, a formação de poros e bolhas na membrana plasmática (*membrane blebbing*), e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (WOODS et al., 2016). Além disso, a ativação do P2X7R desencadeia o efluxo de  $\text{K}^+$  e a ativação do panx-1, um membro da família panexinas. Conforme já relatado, as panexinas são proteínas que compartilham características estruturais com as conexinas, expressas na membrana plasmática e capazes de formar junções de abertura funcional (hemicanal). Assim, propõe-se que o P2X7R e o hemicanal panx-1, ativam o inflamassoma NLRP3, uma família dos receptores do tipo domínio de oligomerização nuclear (NOD- do inglês *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*) (CAUWELS et al., 2014; DI VIRGILIO, 2007).

Os receptores do tipo NOD são encontrados no citoplasma de diferentes células, incluindo linfócitos, macrófagos e micróglia, e desempenham a regulação da resposta imune inata (MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009). Através destes receptores o sistema imunológico humano identifica padrões moleculares associados a patógenos exógenos (bactérias), sinais de perigo endógenos (baixas concentrações de  $\text{K}^+$  intracelular), ou padrões associados a danos em tecidos ou células lesionadas (estresse oxidativo celular) (ABAIS et al., 2015; WEI et al., 2019).

Essa família de receptores apresenta na sua estrutura três domínios: um domínio carboxi-terminal constituído de regiões ricas em leucina (LRR) responsável pelo

reconhecimento da molécula patógena; um domínio NOD, responsável pela oligomerização do receptor após a ligação com o ATP (NACHT); e um domínio amino-terminal, que desencadeia a função efetora do receptor, que pode ser um domínio pirina (PYD - do inglês *pyrin domain*) ou outros domínios, como o domínio de recrutamento de caspase (CARD- do inglês *caspase recruiting domain*). Quando os NLRs são ativados ocorre uma modificação estrutural no receptor, que permite a ligação do ATP ao domínio NOD e promove a oligomerização, uma sinalização celular característica de cada NLR, que promove à formação do inflamassoma, os quais existem seis tipos, entre eles o NLRP3 (BARBÉ; DOUGLAS; SALEH, 2014; LAMKANFI; DIXIT, 2014).

O inflamassoma NLRP3 é um complexo proteico de alto peso molecular com domínio N-terminal do tipo PYD, que não conseguem ativar diretamente a caspase-1, sendo necessário recrutar uma molécula adaptadora, a ASC (do inglês, *apoptosis-associated speck-like containing a CARD domain*). A ASC contém um domínio CARD que recruta e promove a auto-clivagem da pró-caspase-1, liberando caspase-1 clivada no citosol, essa por sua vez induz a conversão das citocinas pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 inativas, nas formas maduras e ativas IL-1 $\beta$  e IL-18, desencadeando o processo inflamatório (LAMKANFI; DIXIT, 2014; MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009).

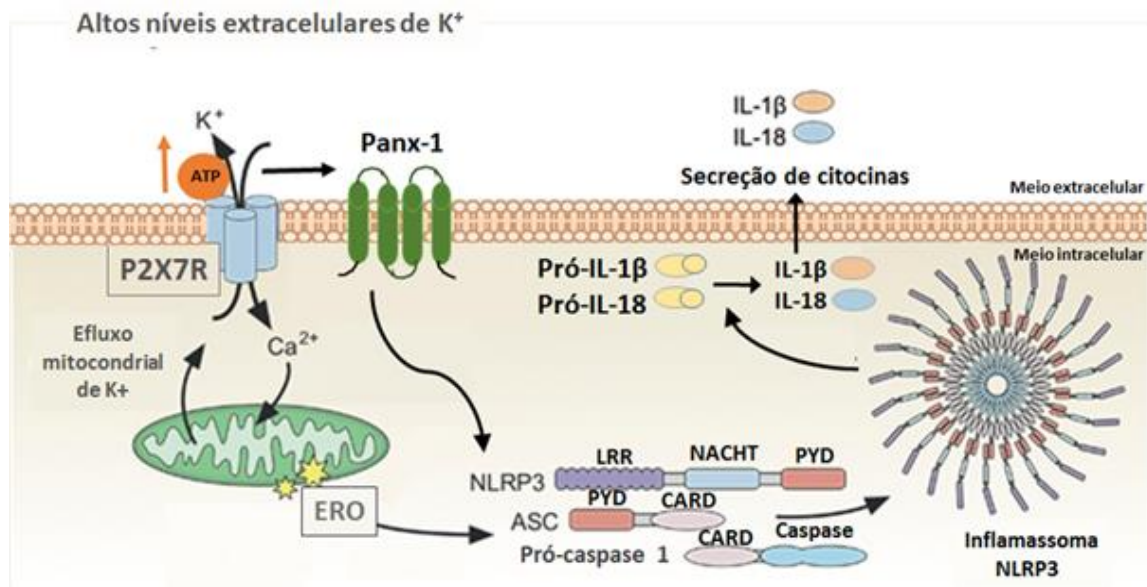
Assim, o inflamassoma NLRP3 atua como um sensor de dano nas células, respondendo ao efluxo de K<sup>+</sup> e por sinais de estresse celular (MARIATHASAN; MONACK, 2007). A agregação de peptídeos endógenos, como o  $\beta$ A, também ativa o inflamassoma e produz citocinas pró-inflamatórias, o que explica a elevação da IL-1 $\beta$  detectada nos cérebros de pacientes com DA (GOLD; EL KHOURY, 2015). Além disso, há evidências que mostram um aumento na expressão do inflamassoma NLRP3 e dos níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no cérebro de ratos em modelo de amnésia por escopolamina (QIU et al., 2016). Estudos sugerem que a ativação desse complexo também pode estar ligada à inflamação mediada pelo declínio cognitivo e alterações neuropatológicas relacionadas ao envelhecimento, sendo a redução desse complexo capaz de prevenir os danos cognitivos (GOLDBERG; DIXIT, 2015; WEI et al., 2019).

Além de promover a liberação de IL-1 $\beta$ , a ativação do P2X7R tem demonstrado regular outras respostas inflamatórias, incluindo a liberação de TNF- $\alpha$ , IL-6 e apoptose (SHIEH et al., 2014). Desta forma, o antagonismo do P2X7R tem demonstrado promover efeitos anti-inflamatórios, o que torna esse receptor um alvo terapêutico promissor para controlar a neuroinflamação e atenuar as consequências neurológicas em diferentes doenças

neurodegenerativas (HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015; WOODS et al., 2016) (Figura 6).

Apesar de não ser classificada como um neurotransmissor clássico como o ATP, pois não é armazenada em vesículas e liberada por exocitose, e não atua predominantemente nas sinapses, a adenosina também tem um importante papel na sinalização purinérgica, sendo sintetizada tanto intra como extracelularmente (CUNHA, 2001). Esse nucleosídeo, um dos produtos resultantes da hidrólise extracelular dos nucleotídeos de adenina, contribui em uma ampla variedade de funções biológicas básicas, incluindo a biossíntese de nucleotídeos e metabolismo energético celular (ELTZSCHIG, 2009). Além disso, a adenosina está presente nos neurônios e nas células gliais, e atua como neuromodulador, sendo capaz de regular a liberação de vários neurotransmissores. A adenosina age na manutenção da homeostase neural, controlando muitos eventos intracelulares como, a hiperpolarização da membrana neuronal, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e a liberação de neurotransmissores excitatórios, promovendo efeitos neuroprotetores contra os danos causados pela excitotoxicidade neural (CHEN, 2014; CUNHA, 2001).

**Figura 6.** Representação esquemática da cascata de ativação do inflamassoma NLRP3 e maturação da citocinas pró-inflamatórias através do receptor P2X7 e a panx 1.



Fonte: Adaptado de YARON et al., 2015.

A adenosina exerce seus efeitos a partir da ligação com quatro subtipos de receptores metabotrópicos pertencentes à família P1, sendo eles os receptores inibitórios A1 e A3 e os

receptores facilitatórios A2A e A2B (FREDHOLM et al., 2011). Os receptores A1 e A2A tornam-se ativos por concentrações basais de adenosina, diferentemente dos receptores A2B e A3 que são ativados somente em níveis extracelulares de adenosina elevados (HAM; EVANS, 2012). A ativação dos receptores A1 e A3 acoplados à proteína G inibitória (Gi), leva à redução da produção do segundo mensageiro, o monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), enquanto a ativação dos receptores A2A e A2B acoplados à proteína G estimulatória (Gs), aumenta a produção de AMPC, através da ativação da enzima adenilato ciclase (FREDHOLM et al., 2011; SHETH et al., 2014).

Os receptores A1 são amplamente distribuídos no cérebro, principalmente em regiões do córtex, do hipocampo, do cerebelo e da medula espinhal, sendo consideravelmente mais abundantes nos neurônios, mas também estão presentes nas células gliais. Esses receptores apresentam um papel inibitório frente à transmissão excitatória do SNC, através do bloqueio dos canais de  $Ca^{2+}$ . Já os receptores A2A também podem ser encontrados na região límbica e regiões neocortical do cérebro, porém sua expressão é maior nos gânglios basais no estriado (CUNHA, 2005). Os receptores A2A estão bastante relacionados com a modulação da plasticidade dos circuitos neuronais, tais como a aprendizagem e a memória (FREDHOLM et al., 2005, 2011). Além disso, evidências sugerem que o A2AR pode regular o processo de neuroinflamação (CUNHA, 2005; REBOLA et al., 2011). Conforme estudos, a superexpressão desses receptores induzem prejuízos a memória (GIMÉNEZ-LLORT et al., 2007; PAGNUSSAT et al., 2015) e o seu antagonismo previne a sinaptotoxicidade e os prejuízos de memória em modelo animal de DA (CANAS et al., 2009; PAGNUSSAT et al., 2015).

As concentrações e o tempo em que moléculas sinalizadoras de ATP, ADP, AMP e adenosina permanecem no espaço extracelular são influenciadas por vários fatores, tais como: secreção e/ou lise celulares, efeito da diluição no espaço extracelular, mecanismos de recaptção e pela ação catalítica de enzimas ancoradas na membrana celular ou localizadas no meio intersticial de forma solúvel. Dentre estas enzimas podem-se destacar as NTPDases (E.C 3.6.1.5, CD39), as E-NPPs (Nucleotídeo pirofosfatases/fosfodiesterases), as fosfatases alcalinas, a 5'-nucleotidase (E.C. 3.1.3.5, CD73) e a adenosina desaminase (ADA, E.C. 3.5.4.4) (YEGUTKIN, 2008; ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012).

Essas enzimas atuam em conjunto formando uma cadeia enzimática que inicia com a ação da NTPDase e da E-NPP, as quais catalisam a hidrólise do ATP e do ADP formando AMP. Em seguida, a enzima 5'-nucleotidase hidrolisa a molécula de AMP formando adenosina, a qual posteriormente é degradada pela ação da ADA gerando inosina. As fosfatases alcalinas removem fósforo inorgânico (Pi) de uma ampla gama de substratos, incluindo nucleotídeos

(ATP, ADP e AMP) produzindo adenosina (CARDOSO et al., 2015; ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012).

A família das NTPDases são enzimas ancoradas à membrana plasmática, que hidrolisa tanto ATP como ADP, até a formação do AMP e requerem a presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  ou magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) (KUKULSKI; LÉVESQUE; SÉVIGNY, 2011). Até então, oito membros dessa família foram identificados, os quais são denominados NTPDases 1 a 8 e diferem quanto à especificidade aos substratos, dependência de cátions divalentes, distribuição tecidual e localização celular. Quatro destas enzimas são localizados na membrana celular com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular (NTPDases 1, 2, 3 e 8), enquanto que as outras quatro exibem localização intracelular (NTPDases 4, 5, 6 e 7) (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006). A NTPDase-1 foi a primeira enzima a ser descrita, sendo capaz degradar os substratos ATP e ADP em iguais proporções (1:1), diferindo das NTPDases 3 e 8, que possuem uma preferência maior pelo ATP em relação ao ADP. Assim como a NTPDase 2, que se caracteriza por apresentar uma ampla preferência por ATP e foi anteriormente classificada como uma ecto-ATPase (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006; ZIMMERMANN, 2011). As NTPDases são expressas em sinaptossomas isolados, bem como em cultura de neurônios primários de córtex cerebral e astrócitos. Estudos imunohistoquímicos têm demonstrado que esta enzima é amplamente distribuída no encéfalo de ratos, encontrando-se presente em neurônios de córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, células gliais e células endoteliais (LANGER et al., 2008).

A 5'-nucleotidase é uma enzima ancorada à membrana plasmática por meio de um glicosilfosfatidilinositol (GPI) e possui seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). O ancoramento da enzima pode ser clivado por uma fosfolipase C específica para GPI dando origem às formas solúveis da enzima. Assim, os sete membros já identificados dessa família apresentam diferentes distribuições celulares, sendo cinco presentes no citosol, um na matriz mitocondrial e outro ancorado na membrana. Além disso, essas enzimas diferem nas propriedades moleculares e cinéticas, bem como na especificidade pelo substrato. A família das 5'-nucleotidasas tem ampla distribuição tecidual e possui a capacidade de desfosforilar vários nucleosídeos monofosfatados não cíclicos, como CMP, IMP, UMP, GMP e AMP em seus respectivos nucleosídeos, mas hidrolisa mais eficientemente o AMP, sendo considerada a principal enzima responsável pela formação de adenosina extracelular (BIANCHI; SPYCHALA, 2003). Assim, a função dessa enzima correlaciona-se diretamente ao seu papel na produção de adenosina, seu efeito neuroprotetor e

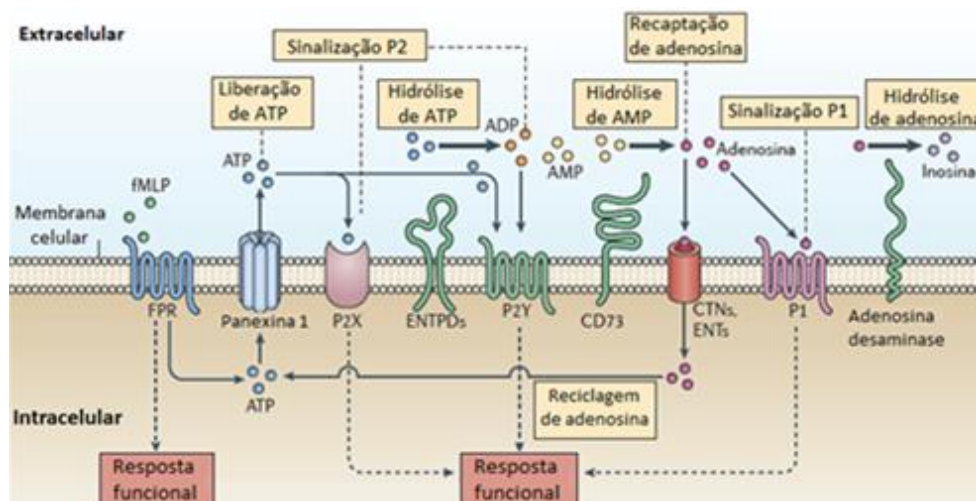
está expressa na superfície de células neuronais e nas sinapses (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

A ADA também faz parte do conjunto de enzimas responsáveis pela degradação sequencial dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina. Portanto é responsável pela desaminação irreversível de adenosina e 2'-deoxiadenosina para inosina e 2'-deoxi-inosina, respectivamente. Desta forma, a ADA é responsável por regular as concentrações extracelulares de adenosina (ANTONIOLI et al., 2012).

Como já referido, as enzimas descritas acima participam do controle dos níveis extracelulares dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina (ATP, ADP, AMP e ADO), as quais estão envolvidas em diversas funções, inclusive no controle da neuromodulação e da neurotransmissão. Assim, muitos estudos têm demonstrado que alterações nas atividades das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e ADA, e na concentração das moléculas sinalizadoras em diferentes patologias, como diabetes (REICHERT et al., 2018), esclerose múltipla (POLACHINI et al., 2014) e outras doenças neurodegenerativas como a DA (BAGATINI et al., 2018; ERB et al., 2019). Estudos realizados em animais submetidos à escopolamina em modelo de déficit de memória também demonstraram alterações na atividade dessas enzimas (ADEMILUYI; OGUNSUYI; OBOH, 2016; GUTIERRES et al., 2012; MARISCO et al., 2013).

Em vista disto, há grande interesse nos mecanismos purinérgicos associados ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, buscando estratégias terapêuticas capazes de melhorar a sinalização purinérgica e, conseqüentemente os danos cognitivos (Figura 7).

**Figura 7** – Visão geral da sinalização purinérgica.



## 2.4 ENVELHECIMENTO E ESTRESSE OXIDATIVO

A expectativa de vida da população e, conseqüentemente, o número de pessoas idosas, com 60 anos de idade ou mais, vêm crescendo no mundo. Em 2017, a população idosa mundial era de 962 milhões, com previsão de chegar a 1,4 bilhão em 2030 e 2,1 bilhões em 2050 (UNITED NATIONS, 2017).

Atualmente, a Europa tem a maior porcentagem de pessoas com 65 anos ou mais (25%). O Brasil tem uma expectativa de vida média de 76 anos e uma população idosa que ultrapassa os 29 milhões, com perspectiva de que, até 2032, esse número possa atingir 32,5 milhões. A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera um país envelhecido quando 14% da sua população possui mais de 65 anos, o que ocorrerá em 2032 (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2015). Os estados com maior proporção de idosos são o Rio de Janeiro e o Rio Grande do Sul, ambas com 18,6% de idosos (IBGE, 2018). Pesquisas apontam que à medida que a população envelhece tem aumentado significativamente a incidência de doenças relacionadas ao envelhecimento, em especial as demências (WHO, 2015).

O envelhecimento pode estar diretamente relacionado ao estresse oxidativo, que aumenta com o avanço da idade e tem papel central nos mecanismos patogênicos da neurodegeneração (ZHU et al., 2007). Os radicais livres são moléculas em que um ou mais elétrons encontram-se desemparelhados nos orbitais externos dos átomos de oxigênio ou nitrogênio, algumas são conhecidas como ERO ou espécies reativas de nitrogênio (ERN). Essas espécies são altamente instáveis e reativas, e possuem tempo de meia-vida curta. As ERO e ERN podem ser de origem endógena, produzidos naturalmente pelo metabolismo em quantidades controladas, ou exógena, como fatores ambientais (HALLIWELL, 2011).

O oxigênio é a principal fonte de radicais livres nos sistemas biológicos, parte desse é reduzido em etapas sequenciais para produção de ATP na mitocôndria, outra pequena parte é transformado em ERO, que também são produzidas pela ação da NADPH oxidase no SNC (KOWALTOWSKI et al., 2009). As ERO são representadas pelos radicais ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ), peroxil ( $ROO^{\cdot}$ ), e podem ser não-radicalares como o oxigênio ( $O_2$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o ácido hipocloroso (HClO). O radical  $HO^{\cdot}$  é o que induz mais efeitos deletérios ao organismo, devido ao seu tempo de meia-vida ser muito curto é dificilmente neutralizado. As ERN também são fisiologicamente produzidas, e incluem o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), óxido nitroso ( $N_2O_3$ ), ácido nitroso ( $HNO_2$ ), nitritos ( $NO_2^-$ ), nitratos ( $NO_3^-$ ) e peroxinitritos ( $ONOO^-$ ) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; BONINI et al., 2014). Assim, o organismo mantém a homeostase celular, atuando na neutralização das espécies reativas e

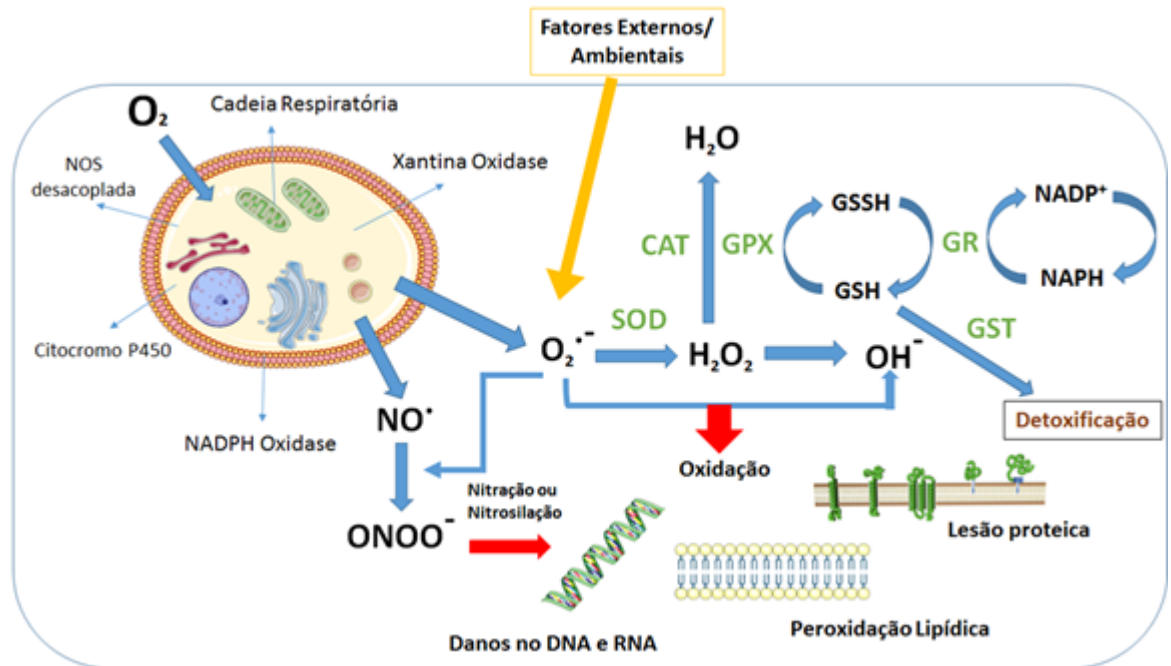


prevenindo os efeitos deletérios induzidos por elas através de um sistema antioxidante, uma complexa rede de reações enzimáticas e não enzimáticas, que exerce proteção celular (COUTO; WOOD; BARBER, 2016). A defesa enzimática envolve a ação conjunta de enzimas intracelulares como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e as glutatonas (HALLIWELL, 2011). As enzimas do sistema das glutatonas incluem a glutatona redutase (GR), que promove a redução da glutatona oxidada a glutatona reduzida (GSH), recuperando esse poderoso antioxidante não enzimático. A GSH também é um co-fator para a glutatona peroxidase (GPx), a qual controla os níveis de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, oriundos do ataque de espécies radicalares no organismo, desempenhando um papel importante na proteção das células contra a peroxidação lipídica. A glutatona S-transferase (GST), atua na detoxificação através da conjugação dos xenobióticos à GSH (AQUILANO; BALDELLI; CIRIOLO, 2014).

As defesas não enzimáticas incluem antioxidantes como a GSH, as vitaminas C, E e A e também os flavonoides, como as antocianinas, as quais são alvos deste estudo. Seus mecanismos de ação são diversos, podendo incluir inibição da formação de espécies reativas e a neutralização dessas e de seus precursores (HALLIWELL, 2006). A GSH é o tiol não-proteico (NPSH) mais abundante nas células animais e sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento tiol (-SH) do aminoácido cisteína (TOWNSEND; TEW; TAPIERO, 2003). A GSH mantém a funcionalidade de antioxidantes exógenos, recuperando as vitaminas C e E oxidadas (PENNINCKX, 2000). Além disso, essa molécula tem um papel importante na síntese e reparo de DNA e proteínas, e na ativação e regulação de enzimas. Também age na remoção do  $H_2O_2$ , na reparação de lipídios peroxidados e na desintoxicação de xenobióticos, principalmente, no fígado e rins. Desta forma, a disponibilidade reduzida de GSH está associada a uma menor probabilidade de sobrevivência das células, o que têm sido demonstrado conforme o avanço da idade (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009; TOWNSEND; TEW; TAPIERO, 2003).

O desequilíbrio entre a produção excessiva de espécies reativas e a capacidade dos antioxidantes em neutralizá-las levam a um quadro de estresse oxidativo. No envelhecimento, há um aumento do estresse oxidativo e redução nos sistemas de reparo celular, que ao longo do tempo podem induzir danos a biomoléculas como DNA, lipídeos e proteínas, ocasionando perdas na funcionalidade de células, tecidos e órgãos, podendo levar ao desenvolvimento de doenças como as neurodegenerativas (DILORETO; MURPHY, 2015; VALKO et al., 2007) (Figura 8).

**Figura 8.** Esquema representando a geração de algumas espécies reativas de oxigênio ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  e  $OH^{\cdot}$ ) e espécies reativas de nitrogênio ( $NO^{\cdot}$  e  $ONOO^-$ ) e os possíveis danos que elas podem causar aos lipídios, proteínas, DNA e RNA. Além das enzimas de defesa antioxidante endógenas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPX), glutatona redutase (GR) e glutatona S-transferase (GST) que neutralizam e detoxificam estas espécies reativas e xenobióticos.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A membrana celular é susceptível à peroxidação lipídica, que promove alterações na sua estrutura, permeabilidade e fluidez, afetando a funcionalidade de proteínas transmembrana como enzimas, receptores e canais iônicos, além de liberação do conteúdo de organelas, levando à formação de produtos citotóxicos (DMITRIEV; TITOV, 2010). Um exemplo é o malondialdeído (MDA), produto final da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados. Níveis elevados de MDA levam a formação de lipoperóxidos e indicam um aumento da peroxidação lipídica (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). Outro marcador de dano oxidativo é a proteína carbonil, produzida através da oxidação das cadeias laterais das proteínas ou de uma reação secundária das cadeias laterais nucleofílicas dos aminoácidos cisteína, histidina e lisina com aldeídos durante a peroxidação lipídica (DALLE-DONNE et al., 2003). Muitos estudos têm identificado o aumento desses biomarcadores em pacientes e animais com déficits cognitivos (GUSTAW-ROTHENBERG; KOWALCZUK; STRYJECKA-ZIMMER, 2010; LEE et al., 2014).

O cérebro é especialmente vulnerável aos danos das espécies reativas, devido ao seu alto conteúdo de ácidos graxos insaturados, alta taxa de consumo de oxigênio e relativa escassez de enzimas antioxidantes como a GPx, GR, SOD e CAT em comparação com outros órgãos como fígado e o rim. Os neurônios possuem um acúmulo de espécies reativas, o que pode ser uma característica comum do envelhecimento, bem como um fator associado a perda progressiva da memória nas demências (JOSEPH; FISHER; CAREY, 2004; NUNOMURA et al., 2006; PAPADOPOULOS et al., 1997).

## 2.5 DEMÊNCIA

Demência é um termo genérico, que se refere a uma síndrome, geralmente, de natureza crônica ou progressiva, caracterizada pela deterioração de células nervosas e consequente declínio das funções cerebrais. Essas alterações afetam a memória e aprendizagem, e outras capacidades cognitivas e comportamentais, as quais interferem significativamente na capacidade do indivíduo em realizar atividades da vida cotidiana (WHO, 2019).

Embora a demência afete principalmente pessoas idosas, e esse seja o principal fator de risco, não é uma consequência inevitável do envelhecimento. A prevalência das demências também é influenciada pelas heranças genéticas, fatores ambientais e comportamentais, como escolaridade e nível socioeconômico. Segundo a OMS, cerca de 50 milhões de pessoas sofrem de demência no mundo, quase 60% dessas vivem em países de baixa e média renda, e esse número pode aumentar para 82 milhões de pessoas em 2030 (WHO, 2019; PRINCE et al., 2013).

Essas doenças são consideradas pela OMS uma prioridade de saúde pública, pois afetam milhões de pessoas no mundo, causam aos indivíduos incapacidade e dependência, o que requer cuidados e auxílios constantes e elevados custos médicos, e em casos mais graves ocasionam a morte, sendo a quinta principal causa de mortalidade no mundo em 2016 (WHO, 2018; WORTMANN, 2012). Assim, a demência promove impactos físicos, psicológicos, sociais e econômicos no indivíduo, na família e na sociedade em geral.

Alguns tipos de demência são a doença de Alzheimer (DA), a doença de Parkinson, a doença de Huntington, a esclerose múltipla, a induzida por deficiência de vitaminas (B1, B12 e niacina) ou pela infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV). Ainda existem as demências vasculares, pós-traumática, com corpos de lewy e frontotemporal. Muitas vezes os tipos de demência são indistintos e as formas mistas coexistem com frequência (DONG et al., 2013; PRINCE et al., 2013). As avaliações neuropsicológicas, os exames incluindo

hemograma, raio-X e neuroimagens (tomografia ou ressonância magnética) são importantes para a detecção etiológica precoce, diagnóstico diferencial e classificação do grau da demência, além de permitirem identificar as causas potencialmente reversíveis (JACK et al., 2011; KNOPMAN et al., 2001).

Dentre os tipos de demência, a DA é a mais comum, representando 60 a 70% de todos os casos de demência acima da faixa etária de 65 anos ou mais. Apesar de ter início tardio, casos precoces também são identificados na faixa etária de 30 a 60 anos, porém com menor frequência. Estima-se que cerca de 35,6 milhões de pessoas tenham a DA no mundo (ANAND; GILL; MAHDI, 2014; SILVA et al., 2014). No Brasil, segundo a Associação Brasileira de Alzheimer (ABRAZ), cerca de 1,2 milhão de brasileiros convivem com esse tipo de demência, contudo os dados são desatualizados, uma vez que surgem em média 100 mil novos casos por ano, a maior parte deles ainda sem diagnóstico (ABRAZ, 2019).

A DA é uma doença neurodegenerativa multifatorial, caracterizada por uma gama de alterações na anatomia, biologia e função do cérebro, que provocam deterioração progressiva da memória e de outras habilidades cognitivas, incluindo alterações na linguagem, orientação, perda da capacidade motora, raciocínio e julgamento. Essas disfunções cognitivas são comumente acompanhadas por quadros de descontrole emocional, alterações de personalidade e humor (FROTA et al., 2011; WEINTRAUB; WICKLUND; SALMON, 2012).

Essa patologia tem início insidioso, os sintomas são graduais, começam sutis com perda da memória recente e se agravam com o passar dos anos. Assim, a DA pode ter três fases: pré-clínica, comprometimento cognitivo leve e demência (SPERLING et al., 2011). Na fase pré-clínica, as mudanças patológicas são assintomáticas, demonstrando que a DA pode começar muito antes dos sintomas e pode progredir para um estágio de comprometimento cognitivo leve com perda subjetiva da memória, ainda nessa fase existe a possibilidade de intervenção medicamentosa, capaz de modificar o curso natural da doença, sendo essa fase, geralmente, utilizada em pesquisas científicas (OTAEGUI-ARRAZOLA et al., 2014; VOS et al., 2013).

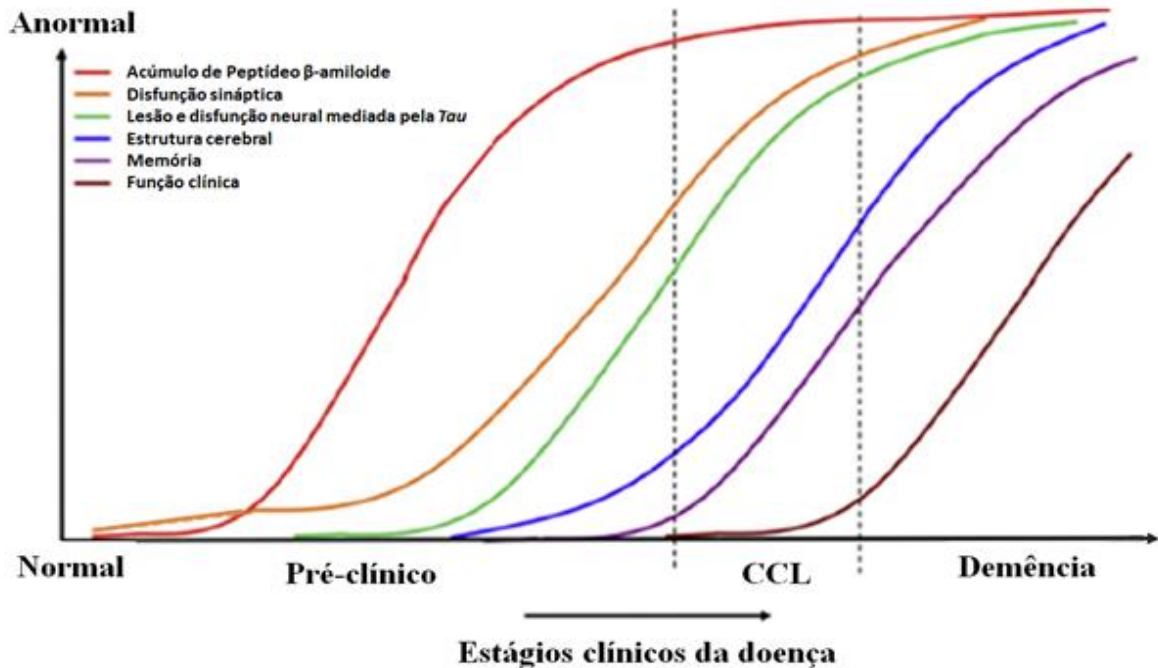
O cérebro de pacientes com DA pode apresentar atrofia cortical, inicialmente na região lobo temporal, especialmente no hipocampo. Um aumento dos sulcos e ventrículos corticais também são observados em exames de imagem, dependendo do estágio de progressão da doença. As alterações nas regiões do córtex cerebral ocorrem gradualmente, por exemplo, o córtex motor, o visual, e o auditivo são afetados somente na fase mais avançada, sendo os sintomas comportamentais subjacentes observados mais tardiamente (CHETELAT; BARON, 2003; REITZ; MAYEUX, 2014).

Duas anormalidades são bem evidenciadas na neuropatologia da DA: as placas senis e os emaranhados neurofibrilares. Os últimos estão associados à presença de mutações e a hiperfosforilação da proteína *tau*, a qual controla a estabilidade dos microtúbulos durante a maturação e o crescimento dos neuritos. Os microtúbulos são estruturas do citoesqueleto das células, estando envolvidos na manutenção da estrutura celular e nos processos da plasticidade neurítica, além de serem essenciais para o transporte axonal de organelas (UBHI; MASLIAH, 2013). A fosforilação anormal da *tau* causa desestabilização dos microtúbulos, o que altera a conformação espacial, levando a agregação da proteína *tau* na forma de filamentos helicoidais pareados que compõem os emaranhados. Assim, nutrientes e outros suprimentos essenciais não conseguem mais ser transportados através das células, levando-as à morte (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2019; GOEDERT; SPILLANTINI, 2006).

As placas senis são formadas devido ao depósito extracelular de peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A). O  $\beta$ A é formado durante a clivagem da proteína precursora de amiloide (PPA), que é uma proteína produzida normalmente por diferentes células, participando da neuroplasticidade e da regulação sináptica (WEINER et al., 2013). A clivagem da PPA pela secretase dá origem a diferentes comprimentos de  $\beta$ A. O  $\beta$ A<sub>1-40</sub> é o mais comum, apresenta-se com 40 resíduos de aminoácidos. O  $\beta$ A<sub>1-42</sub> com 42 resíduos e hidrofóbico é o menos comum, contudo tem maior potencial para formar oligômeros neurotóxicos, que constituem placas insolúveis no tecido neuronal (KUMAR et al., 2015) (Figura 9).

A presença de mutações gênicas na DA, pode acarretar em uma superprodução da  $\beta$ A, principalmente, da forma  $\beta$ A<sub>1-42</sub> mais tóxica, as quais são capazes de bloquear a atividade mitocondrial, alterar os níveis intracelulares de cálcio, ativar a micróglia e estimular processos inflamatórios e oxidativos, evidenciando a “hipótese da cascata amiloide” (SPERLING et al., 2011). A hipótese presume que a deposição de  $\beta$ A é a principal responsável pelas demais características neuropatológicas da DA, incluindo a formação de emaranhados neurofibrilares e outras alterações neuroquímicas generalizadas, que levam a perda da função neuronal. Evidências sugerem que o acúmulo de  $\beta$ A é observado muitos anos antes de ocorrer a degeneração neuronal e demência, sendo considerado biomarcador no diagnóstico da DA. Entretanto, os mecanismos pelo qual o  $\beta$ A e a *tau* atuam como agentes tóxicos nos neurônios na DA ainda não estão totalmente elucidados (JACK et al., 2011; SINGH et al., 2013).

**Figura 9.** Dinâmica dos biomarcadores na cascata patológica da doença de Alzheimer. Os biomarcadores mudam de normais para extremamente anormais (Eixo Y) em função dos estágios clínicos da doença: pré-clínico, comprometimento cognitivo leve (CCL) e demência (Eixo X).



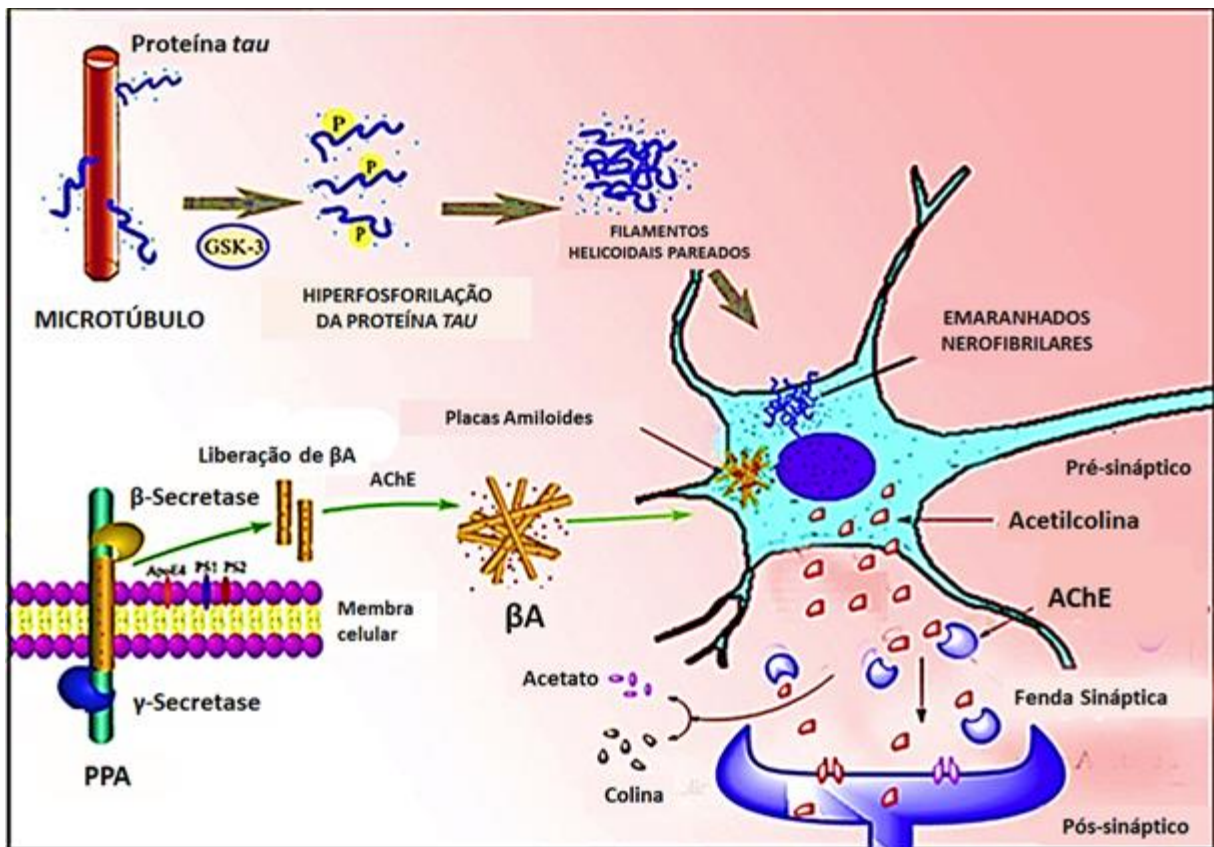
Fonte: Adaptado de SPERLING et al., 2011.

Na DA, além dos emaranhados e placas senis, pode-se observar a degeneração das projeções neuronais e perda dos terminais colinérgicos associados a lesões no prosencéfalo basal, especialmente no núcleo basal de Meynert (AGIS-TORRES et al., 2014). A consequência desses danos é a diminuição nos níveis do neurotransmissor ACh, que ocorre devido à redução da atividade da ChAT, o aumento da atividade da AChE, a redução da recaptção de colina e a redução do número de receptores muscarínicos e nicotínicos, comprometendo a neurotransmissão colinérgica, e subsequentemente, a memória e outras funções cognitivas (SINGH et al., 2013)

Em vista disso, formulou-se a hipótese colinérgica, definindo que a disfunção na neurotransmissão colinérgica contribui substancialmente para o declínio cognitivo observado na DA (CRAIG; HONG, MCDONALD, 2011). Baseando-se nessa hipótese, surgiram os primeiros fármacos direcionados para a inibição das enzimas colinesterases como a AChE, que aumentam a disponibilidade de ACh na fenda sináptica e facilitam a transmissão colinérgica (ANAND; GILL; MAHDI, 2014). No entanto, o uso de inibidores como a tacrina, a galantamina, a rivastigmina e o donepezil não previnem ou curam a DA, apenas tratam os

sintomas e controlam a progressão da doença, além de apresentarem efeitos colaterais, tais como toxicidade hepática, cardiovascular, gastrointestinal, entre outros (PEPEU; GIOVANNINI, 2010). Estudos mostram que as hipóteses da cascata amiloide e colinérgica são aceitas, e experimentos *in vitro* e *in vivo* indicam que ambas estão inter-relacionadas (GUPTA et al., 2011). A AChE e a BChE regulam a formação de PPA e aumentam os  $\beta$ A e sua toxicidade, acelerando a formação dos aglomerados e estabilizando os complexos, assim o uso de fármacos inibidores das colinesterases leva à diminuição das placas amiloides em pacientes com DA (SILVA et al., 2014) (Figura 10).

**Figura 10.** Representação esquemática da patogênese da DA, baseada na disfunção colinérgica, acúmulo de peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) e formação de placas amiloides, além da hiperfosforilação da proteína *tau* e depósito de emaranhados neurofibrilares.



Fonte: Adaptado de SINGH et al., 2013.

Além das disfunções colinérgicas, o estresse oxidativo também desempenha um papel fundamental na patogênese da demência. Uma vez que muitos biomarcadores de estresse oxidativo são encontrados no cérebro, líquido cefalorraquidiano, plasma e urina de pacientes com DA, incluindo excessiva peroxidação lipídica, oxidações de proteínas e dano no DNA e

RNA, além disso, há um comprometimento das defesas antioxidantes (NUNOMURA et al., 2006; PERSSON; POPESCU; CEDAZO-MINGUEZ, 2014).

No entanto, ainda é controverso se o estresse oxidativo é um fator desencadeador da DA ou está associado às alterações histopatológicas típicas e a progressão dessa doença. Existem estudos que mostram a presença de dano oxidativo nos estágios iniciais da DA, precedendo a deposição de  $\beta A_{1-42}$  (NUNOMURA et al., 2006). Contudo, evidências mostram que as  $\beta A$  e seu precursor PPA possuem alta afinidade por biometais como o ferro, o cobre e o zinco (MIURA et al., 2000). A  $\beta A$  ao combinar-se com eles em seus *status* redox ativo, induzem a produção de ERO, o que leva a excessiva peroxidação lipídica e oxidação de proteínas, que pode afetar enzimas críticas às funções neuronais e gliais, e desencadear a neurodegeneração (BUTTERFIELD; BOYD-KIMBALL, 2006; HUANG; ZHANG; CHEN, 2016). As ERO geradas pela  $\beta A$  e os metais de transição não estão somente associados a danos aos componentes dos tecidos como também são capazes de induzir à produção de agregados  $\beta A_{1-42}$  (HUANG; ZHANG; CHEN, 2016).

Entretanto, algumas pesquisas têm demonstrado que o dano oxidativo ocorre nas fases iniciais da doença, porém diminui após a deposição das placas senis. Acredita-se que o acúmulo de  $\beta A_{1-42}$  seria uma defesa do cérebro a exposição prolongada às espécies reativas, e que ao longo do tempo induziria processos tóxicos que culminam na morte celular por apoptose e neurodegeneração (SINHA et al., 2013). Portanto, os compostos antioxidantes por prevenir o aumento do estresse oxidativo têm sido investigados como um tratamento alternativo na prevenção ou retardo da progressão da DA (JIA et al., 2012a; SHIH et al., 2010).

Assim, muitos estudos *in vivo* e *in vitro* têm apresentado diferentes modelos de demência pré-clínica utilizados para revelar os processos degenerativos, os déficits cognitivos associados à DA e planejar novas estratégias terapêuticas. Dentre esses modelos estão o envelhecimento natural, a indução por alumínio,  $\beta A$  ou estresse por ruído e os modelos farmacológicos de indução por corticosterona, estreptozotocina ou escopolamina, entre outros.

## 2.6 ESCOPOLAMINA

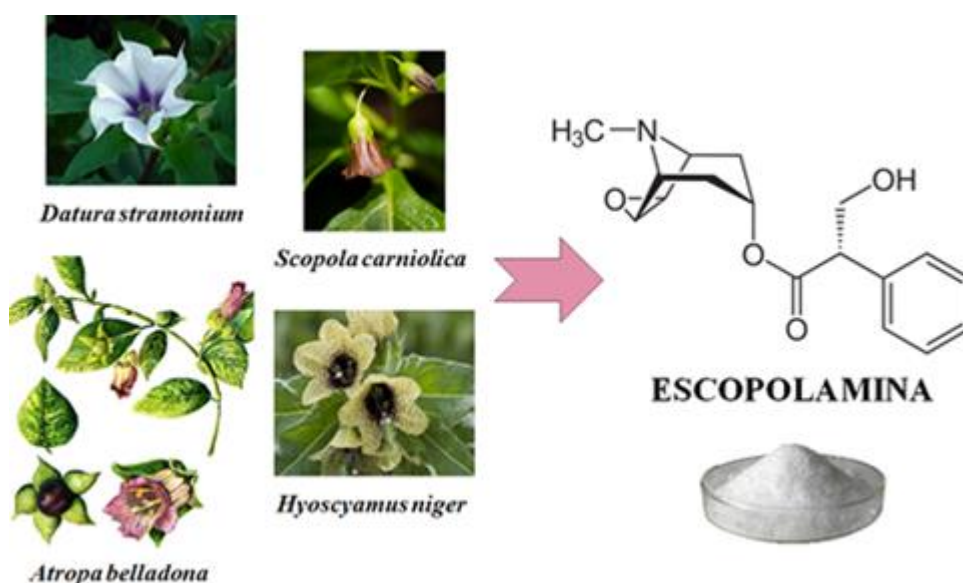
Muitos extratos vegetais têm sido reconhecidos por interferirem no estado mental dos indivíduos desde os tempos antigos. Após ingeridos os extratos induziam alucinações, fazendo com que a maioria das vezes o indivíduo entrasse em um estado delirante, perdendo o senso de realidade e a capacidade de recordar os acontecimentos do período de intoxicação. Um exemplo é o extrato de *Atropa belladonna* L., popularmente conhecida como beladona, assim



denominada na Idade Média, devido a uma prática comum entre as mulheres da época em aplicar o extrato nos olhos para induzir a dilatação das pupilas (midríase), considerada sinônimo de beleza. Descobriu-se que seus efeitos decorriam da presença de concentrações elevadas de alcaloides tropânicos, entre eles a escopolamina (KLINKENBERG; BLOKLAND, 2010b; MARTINEZ; ALMEIDA; PINTO, 2009).

Assim, a escopolamina é obtida a partir de plantas da família Solanaceae, das quais além da beladona também fazem parte a *Scopola carniolica*, a *Hyoscyamus niger* e a *Datura stramonium*, dentre outras. A escopolamina é caracterizada pelos ésteres formados a partir da combinação do ácido trópico (aromático) e a escopina, demonstrando a presença de uma amina terciária e uma estrutura bicíclica. Essa estrutura é relativamente apolar, tendo assim uma boa solubilidade lipídica, fazendo com que a sua absorção gastrointestinal seja completa e rápida e também atravesse a barreira hematoencefálica (RENNER; OERTEL; KIRCH, 2005) (Figura 11).

**Figura 11.** Estrutura química da escopolamina, alcaloide obtido das plantas da família Solanaceae.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A escopolamina possui propriedades anticolinérgicas, pois atua como antagonista competitivo dos receptores muscarínicos, bloqueando os efeitos da ACh. Esse fármaco tem ação não-seletiva sobre os receptores muscarínicos, assim não tem especificidade por nenhum dos subtipos desses receptores, podendo se ligar do M1 ao M5, e em altas concentrações

também pode antagonizar receptores nicotínicos. Desta forma, a escopolamina pode afetar várias funções fisiológicas centrais e periféricas (KLINKENBERG; BLOKLAND, 2010a).

Os efeitos periféricos são induzidos pelo antagonismo dos receptores M3, que ocasiona midríase e paralisia do músculo ciliar (ciclopeia). Esse antagonismo pode causar ainda a diminuição do tônus do músculo liso das vias respiratórias, da uretra e bexiga, e do trato gastrointestinal, nesse último tem efeitos antiespasmódicos e antieméticos, que aliviam o enjoo do movimento (NACHUM; SHUPAK; GORDON, 2006). Além disso, a ação anti-secretora das glândulas salivares (xerostomia), sudoríparas e das vias respiratórias é relatada. A inibição dos receptores M2 induz efeitos cardíacos dose-dependentes, como bradicardia em baixas doses e taquicardia em doses elevadas. Em vista disso, esse fármaco parassimpaticolítico pode ter aplicações clínicas, sendo utilizado em condições que requerem a diminuição da atividade parassimpática, a qual também está diretamente relacionada aos seus efeitos adversos (ANTOR et al., 2014; RENNER; OERTEL; KIRCH, 2005).

A ação da escopolamina no SNC é mediada, principalmente, pelo antagonismo dos receptores M1 e, possivelmente, do M5, uma vez que é preponderante a presença desses receptores nos tecidos neuronais, como no hipocampo e no córtex cerebral (RENNER; OERTEL; KIRCH, 2005). Os efeitos centrais causados pela administração de escopolamina em pequenas doses são potentes e podem ocasionar tontura, vertigem e fadiga. Alguns sintomas como alucinações, euforia, comportamento paranoico, delírio, desorientação e irritabilidade também são observados em altas doses (KLINKENBERG; BLOKLAND, 2010b).

No entanto, a principal característica farmacológica da escopolamina é a indução de amnésia. Essa propriedade foi identificada no século XX, fazendo com que a escopolamina associada à morfina fosse utilizada na analgesia obstétrica, para produzir amnésia e sedação (KLINKENBERG; BLOKLAND, 2010b). Além disso, a escopolamina também é considerada uma droga de abuso, especialmente para a prática de roubos, sequestros e abusos sexuais, fato este popularmente denominado “Boa noite, Cinderela”, ao ingerir a bebida misturada com a droga, a pessoa tem amnésia retrógrada e comportamento submisso (SÁIZ et al., 2013).

Atualmente, a escopolamina tem sido amplamente empregada na neuropsicofarmacologia, como uma droga de referência na indução de déficits cognitivos em diversos animais (LI et al., 2016; MARTINI et al., 2018; PARK et al., 2016). Esse modelo de amnésia ocorre através da perturbação da neurotransmissão colinérgica central pelo antagonismo dos receptores M1 e tornou-se reconhecido após a formulação da hipótese colinérgica para o declínio das funções cognitivas na DA. Assim, prejuízos na aprendizagem e memória causados pela administração de escopolamina em animais, mimetizam os danos

associados ao envelhecimento ou às demências em humanos (CAN et al., 2018; KLINKENBERG; BLOKLAND, 2010b).

Muitos estudos têm utilizado diversas tarefas comportamentais para avaliar os efeitos da escopolamina sobre o desempenho mnemônico de animais, e validar modelos de distúrbios das funções cognitivas, entre eles o labirinto em Y, o reconhecimento de objetos, a esQUIVA inibitória, o labirinto aquático de Morris (HONG et al., 2018; LI et al., 2016). A partir desses testes foi demonstrado que a administração intraperitoneal de escopolamina em diferentes doses é capaz de causar prejuízos a memória e aprendizagem nos animais. Acredita-se que esses efeitos são mais consistentes na aquisição/aprendizagem, MCD e memória de trabalho, porém danos na consolidação da memória também são observados (BOTTON et al., 2010). Além disso, há evidências da capacidade da escopolamina em alterar a atividade locomotora dos animais, o que não é observado em alguns estudos (MARTINI et al., 2018). Segundo autores, essas alterações podem indicar que os resultados dos testes comportamentais não são em decorrência dos déficits de memória, mas sim devido às alterações na locomoção dos animais (GUTIERRES et al., 2012). As discrepâncias nos resultados indicam que os protocolos são dependentes dos parâmetros experimentais utilizados, como a dose, o tempo de administração, a idade, o número de treinos dos animais, o tempo da injeção antes do treino, entre outros (KLINKENBERG; BLOKLAND, 2010b).

Sabe-se que a escopolamina pode ser administrada por diferentes vias, como pelas vias oral, subcutânea, intramuscular, intravenosa, ocular e transdérmica, intracerebral e intraperitoneal. Esse fármaco é metabolizado no fígado (por conjugação) e excretado na urina, em sua maior parte conjugado, possivelmente com o ácido glicurônico ou sulfato. Além de atravessar a barreira hematoencefálica, pode penetrar a placenta e ser distribuída no leite. Possui biodisponibilidade limitada quando administrada por via oral, devido ao extenso metabolismo de primeira passagem, indicando que essa via não é eficaz em modelos experimentais (RENNER; OERTEL; KIRCH, 2005).

Há evidências que esse fármaco também induz alterações na sinalização purinérgica, uma vez que é capaz de modular a atividade das ectoenzimas e a expressão dos receptores purinérgicos (ADEMILUYI; OGUNSUYI; OBOH, 2016; GUTIERRES et al., 2012; MARISCO et al., 2013). Além disso, estudos também têm demonstrado que a escopolamina induz o estresse oxidativo, tais efeitos estão associados aos déficits cognitivos também observados nas doenças neurodegenerativas (BUDZYNSKA et al., 2015; GUTIERRES et al., 2012; MARISCO et al., 2013).

Alguns compostos bioativos são capazes de reverter déficits cognitivos induzidos por escopolamina em animais, e melhorar a função cognitiva em animais saudáveis. Desta forma, o modelo escopolamina pode ser considerado uma maneira simples e rápida para estudar novas substâncias e mecanismos capazes de prevenir e/ou tratar as disfunções cognitivas (HONG et al., 2018).

Segundo HAIDER et al. (2016), o modelo de demência induzida por escopolamina em roedores revelou-se o mais apropriado para obter o perfil do comprometimento cognitivo e explorar novas estratégias terapêuticas, quando comparado a outros modelos fisiológicos, farmacológicos e ambientais de indução de demência. Conforme esse estudo, a administração de escopolamina durante 14 dias induziu déficits cognitivos significativamente mais pronunciados que em outros modelos, evidenciado pelo desempenho prejudicado nas tarefas comportamentais de reconhecimento de objetos, labirinto aquático de Morris e esQUIVA passiva. Além disso, o aumento do estresse oxidativo e a disfunção de neurônios colinérgicos foram mais acentuadamente após o tratamento com escopolamina, quando comparado a outros modelos de demência. No entanto, nenhum modelo animal mimetiza completamente todos os aspectos cognitivos afetados no cérebro humano na DA (HAIDER; TABASSUM; PERVEEN, 2016).

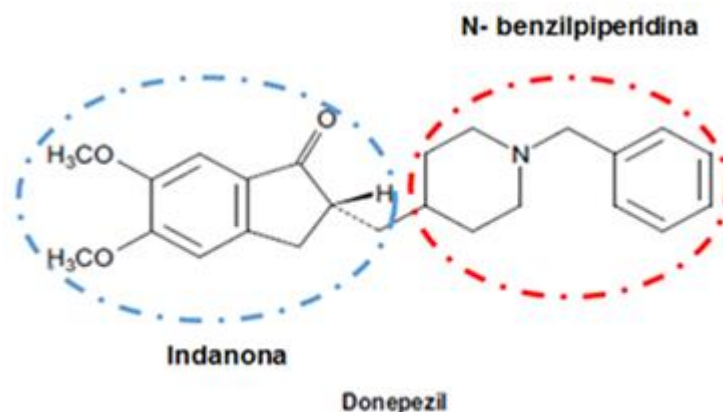
## **2.7 DONEPEZIL**

O donepezil, quimicamente conhecido como 1-benzil-4-[ (5,6-dimetóxi-1-indano-2-il)metil]piperidina, é um inibidor misto das enzimas colinesterases, exibindo uma maior inibição não competitiva que competitiva (DA SILVA et al., 2006). O cloridrato de donepezil foi o segundo medicamento aprovado pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) (1996) para o tratamento dos sintomas de pacientes com DA leve a moderada, mostrando-se eficaz na redução dos sintomas cognitivos, funcionais e comportamentais a longo prazo, e também postergando a dependência e a necessidade de cuidados do paciente (DOOLEY; LAMB, 2000; JACKSON; HAM; WILKINSON, 2004).

Esse fármaco é um inibidor reversível, altamente potente e seletivo para a AChE, tendo pouca ação sobre a BChE ou outras colinesterases, quando comparado a outros inibidores como a tacrina ou a rivastigmina. Confirmando essa maior seletividade para a AChE, estudo mostra que a relação da concentração de donepezil necessária para produzir uma inibição de 50% (IC50) da BChE e da AChE foi de 405:1 para humanos e de 1252:1 para roedores (DOOLEY; LAMB, 2000). Essa classe de inibidor é do tipo piperidina, pois a estrutura do donepezil é

formada por uma subunidade indanona e uma N-benzilpiperidina (SUGIMOTO et al., 2002) (Figura 12).

**Figura 12.** Estrutura do fármaco donepezil, com as subunidades N-benzilpiperidina (VERMELHO) e indanona (AZUL).



Fonte: Adaptado DOOLEY; LAMB, 2000.

As subunidades do donepezil interagem com vários resíduos de aminoácidos do sítio ativo da AChE. O grupamento benzil da molécula de donepezil interage com o resíduo de aminoácido triptofano da enzima, Trp84, presente no final da cavidade catalítica, e não interage diretamente com a tríade catalítica (Ser200-His440-Glu327) (DA SILVA et al., 2006). Além disso, os resíduos de tirosina e fenilalanina, Tyr70, Tyr121, Phe330 e Tyr334, que estão localizados entre o sítio catalítico e o PAS, também desempenham um papel importante nessa interação. Acredita-se que a porção piperidina liga-se ao resíduo Tyr70, e os resíduos Phe330 e Tyr334 são um sítio adicional de ligação (SAXENA et al., 2003). No PAS, o anel de indanona interage com o resíduo de Trp279, a ligação do donepezil com a AChE é extremamente dependente dessa interação, pois resíduos Trp279 e Phe330 não estão presentes na BChE, isso poderia explicar a alta especificidade do donepezil para a AChE e não para a BChE (DA SILVA et al., 2006; KRYGER; SILMAN; SUSSMAN, 1999).

A inibição da AChE impede a hidrólise da ACh, provocando um aumento na disponibilidade desse neurotransmissor na fenda sináptica, restaurando a estimulação dos receptores colinérgicos no SNC, o que melhora os déficits cognitivos observados na demência. Esse efeito independe da fonte da enzima, pois o donepezil inibe igualmente a AChE no cérebro de ratos e nos eritrócitos humanos (GOLDSMITH; SCOTT, 2003; PEPEU; GIOVANNINI, 2010).

Ao contrário de outros inibidores, o donepezil tem um tempo de meia-vida mais prolongado, cerca de 48 a 78 horas, permitindo uma administração diária única (JACKSON; HAM; WILKINSON, 2004). Após uma dose oral de 5 ou 10 mg, a concentração máxima no plasma é de 7,2 - 25,6 µg/L, sendo alcançado 2,4 - 4,4 horas após sua administração, e atingindo o estado de equilíbrio após 14 a 22 dias de ingestão diária. Ele tem absoluta biodisponibilidade oral e ampla ligação às proteínas, e sua absorção não é afetada pela ingestão de alimentos (DOOLEY; LAMB, 2000).

O donepezil é conhecido por ser um inibidor de ação central, devido a sua boa permeabilidade através da barreira hematoencefálica e penetração no cérebro, no qual a concentração pode estar 6 a 7 vezes maior que no plasma (SUGIMOTO et al., 2002). No fígado, sofre extensiva metabolização de primeira passagem pela ação do citocromo P450, CYP-2D6 e CYP-3A4, embora alguns estudos revelem que uma pequena parte da droga é eliminada pela urina de forma inalterada (TISEO; PERDOMO; FRIEDHOFF, 2002).

Apesar do donepezil ser metabolizado pelo citocromo P450, quando administrado concomitantemente a outros fármacos, geralmente, não ocorrem interações medicamentosas (DOOLEY; LAMB, 2000). O donepezil causa apenas um risco teórico de bradicardia, uma vez que as células marca-passo do coração recebem inervação autonômica colinérgica, através das quais liberam ACh para os receptores muscarínicos, cuja ativação pode diminuir a frequência cardíaca (DHEIN; VAN KOPPEN; BRODDE, 2001). Porém, esse risco é clinicamente inexpressivo, assim, o uso de donepezil concomitante com outros medicamentos que possam reduzir a frequência cardíaca, como beta bloqueadores e a digoxina, não causa prejuízos cardiovasculares significativos (JACKSON; HAM; WILKINSON, 2004; RELKIN et al., 2003).

No entanto, a administração de inibidores das colinesterases podem induzir efeitos adversos no sistema gastrointestinal (PEPEU; GIOVANNINI, 2010). A presença de inervação colinérgica no sistema nervoso parassimpático mostra que esses fármacos, apesar de melhorarem a neurotransmissão colinérgica, podem aumentar a motilidade intestinal e a secreção de ácido clorídrico, que é controlada pelas fibras pós-ganglionares vagais colinérgicas (LANCTÔT et al., 2003).

A segunda geração de inibidores, como o donepezil, promove efeitos colaterais gastrointestinais mais brandos como: náuseas, vômitos e diarreia (FILLIT et al., 2006). Além disso, insônia e outros distúrbios do sono também são relatados após o uso de donepezil. Esses efeitos podem estar relacionados ao tempo meia-vida longo e ao período de administração, pois ele é particularmente administrado ao entardecer, resultando em uma concentração plasmática

máxima à noite. Logo, esses efeitos podem ser suprimidos apenas modificando o horário da administração, na parte da manhã ao invés da noite (GAUTHIER, 2001; JACKSON; HAM; WILKINSON, 2004).

O donepezil não é hepatotóxico, não havendo necessidade do monitoramento dos níveis das transaminases (FILLIT et al., 2006). Outras alterações nos sinais vitais ou nos exames hematológicos e bioquímicos não foram observadas após seu uso a curto ou longo prazo (DOOLEY; LAMB, 2000).

A dose recomendada inicialmente é de 5 mg/dia via oral, em países da América e Europa. A fim de alcançar um estado de equilíbrio e minimizar os efeitos adversos, essa dose deve permanecer durante algumas semanas, e posteriormente, pode ser aumentada para 10 mg/dia. No Japão, o tratamento inicia-se com a dose de 3 mg/dia por uma a duas semanas, sendo após aumentada para 5 mg/dia. As doses mais baixas minimizam a ocorrência de efeitos colaterais, o que corrobora com alguns estudos que verificaram que uma dose de 5 mg de donepezil geralmente não prejudica pacientes com função renal ou hepática comprometidas (DOOLEY; LAMB, 2000).

Em estudos de curto prazo com o donepezil (5 e 10 mg/dia), a maioria dos efeitos adversos apresentados foram leves e transitórios, e geralmente relacionados ao sistema colinérgico, demonstrando um bom perfil de tolerabilidade na prática clínica e em ensaios experimentais (PEPEU; GIOVANNINI, 2010). Assim, devido à maior ação seletiva, boa tolerabilidade e facilidade de administração, além da eficácia terapêutica, o donepezil é considerado um tratamento de primeira linha para a DA leve a moderada (JACKSON; HAM; WILKINSON, 2004; BONNER; PESKIND, 2002).

Além de ser muito administrado na prática clínica, a utilização do donepezil em pesquisas com modelos de comprometimento da memória em animais está bem evidente (BARAI et al., 2018; BHUVANENDRAN et al., 2018; MARTINI et al., 2018). Muitos estudos mostram que o donepezil além de melhorar a função cognitiva através da restauração da neurotransmissão colinérgica, também desempenha um papel antioxidante. Diferentes concentrações de donepezil reduziram os níveis de MDA e GSH, restauraram a atividade das enzimas SOD e CAT no córtex e hipocampo de animais em modelo de amnésia induzida por escopolamina (HONG et al., 2018; LI et al., 2016; ODUBANJO et al., 2018; UMUKORO et al., 2014). Além disso, estudos *in vivo* e *in vitro* em cérebros de animais com disfunção mitocondrial associada à  $\beta$ A, o donepezil inibiu o acúmulo de  $\beta$ A, prevenindo edema mitocondrial e restaurando a produção de ATP (YE et al., 2015).

Assim esse fármaco pode proteger os neurônios por meio da melhora da homeostase redox (ATUKEREN et al., 2017) e prevenir a neuroinflamação mediada por espécies reativas. No entanto, os mecanismos desses efeitos antioxidantes e neuroprotetores não estão claros (UMUKORO et al., 2014).

## 2.8 COMPOSTOS NATURAIS

Muitos compostos naturais têm sido utilizados na prevenção e tratamento de doenças há milhares de anos. O interesse e as pesquisas vêm se intensificando em torno dos produtos naturais e seus princípios ativos, pois apresentam inúmeras propriedades benéficas e por serem, na maioria das vezes, mais seguros e possuírem menos efeitos colaterais que a medicação convencional (ATANASOV et al., 2015). Há evidências que apontam o estresse oxidativo como um dos mecanismos envolvidos na progressão de doenças neurodegenerativas (PERRY et al., 2008). Em vista disto, muitos estudos estão sendo realizados na tentativa de encontrar antioxidantes naturais que neutralizem o excesso de espécies reativas e previnam ou minimizem os déficits cognitivos (DE OLIVEIRA et al., 2019; ODUBANJO et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019). Existe na natureza uma grande variedade de antioxidantes, contudo os compostos fenólicos provenientes da dieta como os flavonoides destacam-se pelo potencial neuroprotetor e por estarem presentes em muitos alimentos, como no cassis, um fruto com pigmentação escura, com alto teor de antocianinas (AYAZ et al., 2019; VEPSÄLÄINEN et al., 2013).

### 2.8.1 CASSIS (*Ribes nigrum* L.)

Na dieta humana, as frutas mais consumidas são do tipo "berries" ou também conhecidas como frutas vermelhas, isto é, pequenos frutos carnosos com coloração que varia do vermelho ao roxo como morangos, framboesas, cerejas, amoras, mirtilos, açaí, bem como o cassis (BEATTIE; CROZIER; DUTHIE, 2005). Há cerca de 10 a 12 espécies de frutas do gênero *Ribes*, a maioria das quais são negras, sendo o cassis (*Ribes nigrum* L.) a que apresenta maior importância econômica (BRENNAN, 2008).

O cassis também conhecido por groselha-negra ou blackcurrant é nativo da Ásia e da Europa Oriental e foi cultivado no norte da Europa há cerca de 400 anos (BRENNAN, 2008; VAGIRI et al., 2013). Os frutos são esferas comestíveis, doces e aromáticos, de coloração roxa escura e com até 12 mm de diâmetro, os quais são frutificados a partir da groselheira-negra, um



pequeno arbusto perene que produz em média cinco quilos de cassis durante o verão (GOPALAN et al., 2012) (Figura 13).

Seu primeiro registro foi feito por Gerarde (1636), que relatou o uso de suas folhas e frutos em chás e misturas medicinais. Em 1800, o uso dessa planta nos jardins de casa tornou-se comum no Reino Unido. Atualmente, o cassis é amplamente cultivado na Europa temperada, Ásia, Nova Zelândia, norte da África, América do Norte e regiões montanhosas da América do Sul (GOPALAN et al., 2012; VAGIRI et al., 2013).

Os frutos do cassis são utilizados industrialmente na produção de sucos, bebida alcoólicas (licor de cassis), chás, doces, sorvetes, compotas e geleias (HUMMER; DALE, 2010). A indústria de cosméticos também está incorporando o cassis em diversas fórmulas de perfumes (Vodka Blackcurrant®, Paris Elysees), produtos para a pele (sérum facial TimeWise®, Mary Kay), cápsulas para o cabelo (Innéov-Nutri-Care®, L'Oréal) e pele (LissOil®, Tiaraju), além de extratos para suplementação dietética (NutriPhy Blackcurrant®, Chr. Hansen) (BALDIOTI, 2015).

**Figura 13.** Fotografias do cassis (*Ribes nigrum L.*) mostrando os arbustos sem frutos (A e B) e com frutos (C) e os frutos isolados (D).



Fonte: Adaptado VAGIRI et al., 2013 (A, B e C) e GOPALAN et al., 2012 (D).

O cassis é constituído por macro e micronutrientes, como fibras, minerais (potássio, cálcio, magnésio e ferro), vitaminas (vitamina C), e por uma grande concentração de compostos fenólicos como os flavonoides (NOUR; TRANDAFIR; IONICA, 2011). Esses são os polifenóis

mais presentes na dieta humana (RENDEIRO et al., 2012) e caracterizam-se por um esqueleto fundamental com 15 átomos de carbono, constituído de dois anéis aromáticos de seis carbonos unidos por uma cadeia de três carbonos, que geralmente contém um átomo de oxigênio (C6C3C6) (QUIDEAU et al., 2011).

Existe uma ampla variedade de flavonoides, os quais apresentam diferentes subclasses, de acordo com a quantidade de grupamentos hidroxilas no anel pirano, o padrão de hidroxilação na estrutura do anel e as substituições nas três posições (NIJVELDT et al., 2001), que podem ser grupamentos hidroxilas, na forma metilada ou com substituintes, tais como acetilações e glicosilações (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

Assim, os flavonoides podem ser encontrados nas formas livre (agliconas) ou, na maioria das vezes, ligados a açúcares (glicosídeos), principalmente, com o O-glicosídeos e na posição 3 do anel (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). Além disso, o potencial antioxidante dos flavonoides pode decorrer da sua estrutura química, devido a elevada reatividade dos grupos hidroxilas que doam elétrons às espécies reativas, quelando e estabilizando-as quimicamente (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011). Os principais grupos dietéticos de flavonoides são flavonas (salsa e aipo), flavanonas (frutas cítricas e tomates), flavonóis (cebolas, alho-poró e brócolis), flavanóis (chá verde, vinho tinto, cacau), isoflavonas (soja) e antocianinas (uva, vinhos e frutas vermelhas) (RENDEIRO et al., 2012).

Estudo mostra que a ingestão média de alimentos ricos em flavonoides pela população brasileira, entre 17 e 88 anos, foi de 79 mg por dia para mulheres e 86 mg por dia para homens, sendo a laranja (70%), a alface (9%), e o tomate (2,5%) as principais fontes. Enquanto a ingestão média diária por indivíduo na Dinamarca foi de 28 mg e na Finlândia foi de 55,2 mg, com frutas contribuindo com 36,5 mg, seguido de chás, vinhos e outras bebidas não-alcoólicas (ABBASI et al., 2012).

No cassis destacam-se as antocianinas, constituindo 80% de todos flavonoides presentes, com teor médio de 250 mg de antocianinas por 100 g de frutas frescas, o que é quatro vezes maior que em outras frutas. Nos Estados Unidos a ingestão média de antocianinas está entre 12 a 215 mg/dia por indivíduo (WU et al., 2006).

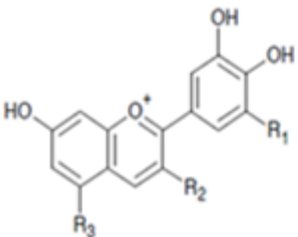
As antocianinas (do grego *anthos*, flor, e *kyanos*, azul) são o maior grupo de pigmentos solúveis em água do reino vegetal, e encontram-se dissolvidas na seiva vacuolar dos tecidos epidérmicos de diversas flores, frutos e vegetais, dando a eles a cor rosa, vermelha, azul ou roxa, dependendo do pH do meio, ou seja, vermelho em condições ácidas e azul em condições básicas (LOPES et al., 2007; MANACH et al., 2004).

Além do pH influenciar na coloração, ele também altera estabilidade e absorção das antocianinas, as quais são maiores em meio ácido. As antocianinas são sensíveis a outros fatores físico-químicos, entre esses, a temperatura, a luz, os solventes, a concentração, a presença de oxigênio, metais, flavonoides, enzimas e possíveis ligações com outras substâncias químicas (LOPES et al., 2007). A absorção de luz UV das antocianinas está distribuída por toda na região visível (400 nm – 700 nm), e a determinação e quantificação delas é feita por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detecção UV em comprimentos de onda em torno de 520 nm (NIELSEN et al., 2003).

Há uma enorme variedade desses flavonoides glicosilados na natureza, contudo quatro principais antocianinas foram identificadas no cassis: cianidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-rutinosídeo, delphinidina-3-O-glicosídeo, e delphinidina-3-O-rutinosídeo (Figura 14).

As antocianinas administradas por via oral são rapidamente absorvidas no estômago, liberadas na circulação sanguínea, metabolizadas no fígado e no rim e excretadas na urina, sendo preferencialmente encontradas na forma de glicosídeo. O intestino delgado também tem a capacidade de absorção, contudo as antocianinas são mais instáveis em meio alcalino do intestino, tendo limitada biodisponibilidade (TALAVÉRA et al., 2005).

**Figura 14.** Estrutura das quatro principais antocianinas encontradas no cassis.

	Composto	R1	R2	R3
	Cianidina-3-O-glicosídeo	H	O-glicosídeo	OH
	Cianidina-3-O-rutinosídeo	H	O-rutinosídeo	OH
	Delphinidina-3-O-glicosídeo	OH	O-glicosídeo	OH
	Delphinidina-3-O-rutinosídeo	OH	O-rutinosídeo	OH

Fonte: Adaptado NIELSEN et al., 2003.

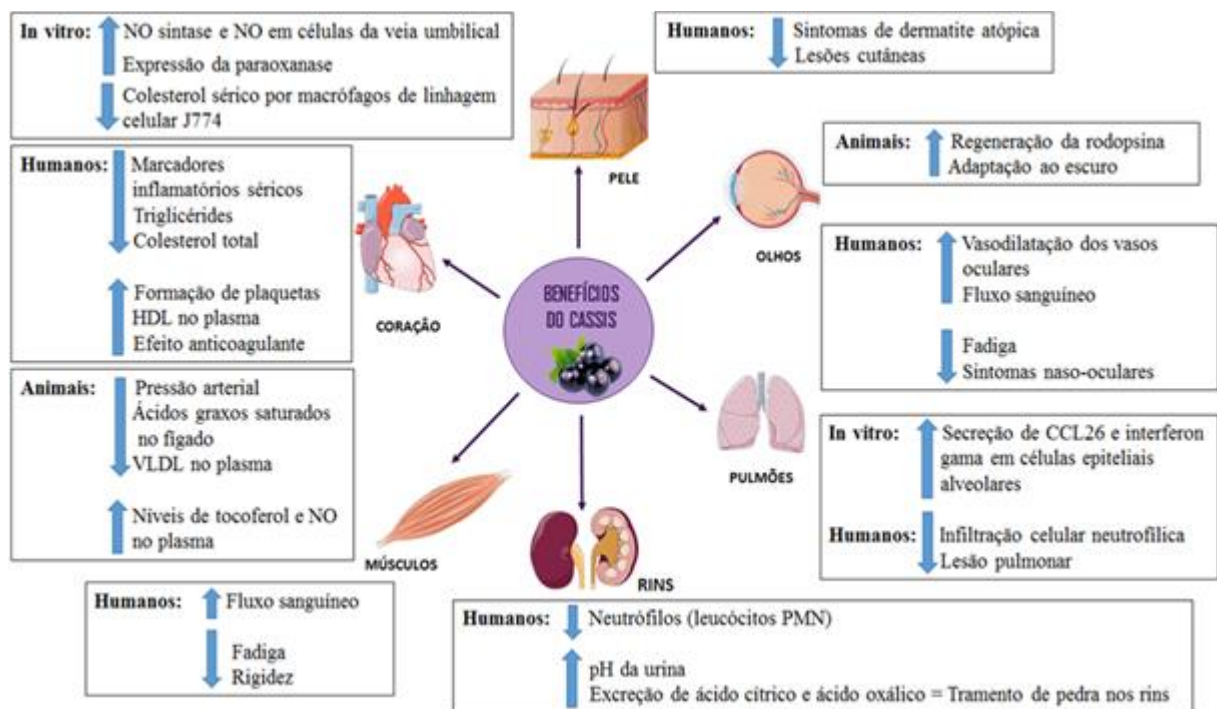
Em estudo com derivados glicosilados de delphinidina e cianidina foi observada uma absorção na forma intacta entre 1,25 - 1,75 horas após sua ingestão em humanos (MATSUMOTO et al., 2001). No entanto, as cianidinas glicosiladas apresentaram pico máximo de absorção de 15 minutos quando um extrato concentrado de amora silvestre (*Morus sp.*) foi administrado a ratos Wistar por via oral (HASSIMOTTO, 2005).

Na absorção da maioria dos flavonoides, o pico máximo alcançado no sangue foi de 1 a 3 horas após ingestão, sendo excretados rapidamente (MATSUMOTO et al., 2001). Conforme estudo, a excreção máxima das antocianinas do cassis ocorrem 120 minutos após sua

administração e diminuem lentamente nas 3 horas subsequentes, mas a quantidade excretada é inferior a 0,1% do ingerido tanto em modelos com animais como em humanos, indicando uma alta biodisponibilidade das antocianinas (MCGHIE et al., 2003).

Muitas pesquisas têm evidenciado que o cassis exerce inúmeras efeitos benéficos para a saúde, os quais são atribuídos ao seu alto teor de compostos bioativos com a antocianinas, que contribuem para o seu potencial terapêutico. Assim, em modelos *in vitro* e *in vivo*, o extrato de cassis têm se destacado pelo elevada capacidade antioxidante, além de possuir propriedades anti-inflamatórias (BENN et al., 2014; JIA et al., 2012a), desempenhando ações cardioprotetoras (YONEI et al., 2009), antimicrobianas (OPREA et al., 2008), anticancerígenas (J. THOPPIL et al., 2012), como relaxantes musculares (MATSUMOTO et al., 2005), melhorando a função ocular (IIDA et al., 2010), entre outras (Figura 15).

**Figura 15.** Uma visão geral dos efeitos terapêuticos e mecanismos protetores do cassis em vários órgãos.



Fonte: Adaptado GOPALAN et al., 2012.

Além de atuar em diversos órgãos, conforme citado anteriormente, estudos têm evidenciado o importante papel neuroprotetor do cassis, o que poderia prevenir os déficits neuronais associados ao envelhecimento ou doenças neurodegenerativas como a DA (KARJALAINEN et al., 2009; SHIH et al., 2010). Sabe-se que as antocianinas são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e entrar no SNC (YOU DIM; SHUKITT-HALE;

JOSEPH, 2004). Corroborando com isso, TALAVÉRA et al., (2005) verificaram a presença de cianidina 3-glicosídeo em cérebro (0,21 nmol/g de tecido) de ratos após uma dieta rica em antocianinas, concentração maior que a do plasma (0,15 nmol/mL), e apenas 30 min após a sua administração por via oral.

Estudos *in vitro* também demonstraram que o extrato de cassis protegeu contra danos neuronais induzidos por estresse oxidativo em cultura de células humanas (GHOSH et al., 2006). Além disso, também inibiu a produção de ERO induzida por PPA em células de neuroblastoma (SH-SY5Y) (VEPSALAINEN et al., 2013).

Em camundongos transgênicos com DA (APdE9), o extrato de cassis modulou favoravelmente o processamento de PPA e o acúmulo de  $\beta$ A no córtex cerebral, bem como melhorou as anormalidades comportamentais como hiperatividade e aprendizagem espacial no labirinto aquático de Morris (VEPSÄLÄINEN et al., 2013).

A suplementação dietética com extrato de cassis durante 12 semanas, reduziu a expressão de  $\beta$ A e melhorou a aprendizagem e memória nos testes esquivo inibitória em modelos de animais com envelhecimento acelerado (SHIH et al., 2010). Além disso, essa suplementação aumentou a atividade de enzimas antioxidantes e reduziu a oxidação lipídica em cérebro e em fígado, em comparação com os camundongos controle. E também reduziu os níveis séricos de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, triglicerídeos, colesterol total e creatinina aumentados pelo envelhecimento (SHIH et al., 2010). Esse estudo sugere que o cassis pode ser considerado um promissor adjuvante para prevenir a deterioração da memória. Baseado neste contexto, torna-se relevante investigar a ação do cassis em um modelo de comprometimento cognitivo induzido por escopolamina.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos neuroprotetores do cassis e de sua associação com o donepezil em modelo experimental de comprometimento cognitivo induzido pela administração crônica de escopolamina.

#### 3.2 Objetivos específicos:

Em camundongos tratados com cassis e/ou donepezil e submetidos ao modelo de amnésia induzida por escopolamina, foram avaliados (as):

- As atividades locomotoras e déficits de memória mediante os testes comportamentais de campo aberto, labirinto em Y, reconhecimento de objetos, labirinto aquático de Morris e esquiiva inibitória;
- A atividade, densidade e expressão das enzimas do sistema colinérgico em córtex cerebral e hipocampo;
- As atividades das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e adenosina desaminase em sinaptossomas de córtex cerebral;
- A densidade dos receptores P2X7 e A2A em membranas totais de córtex cerebral;
- A expressão dos marcadores inflamatórios NLRP3 inflamassoma e interleucina-1 $\beta$  em córtex cerebral;
- Os níveis dos indicadores de estresse oxidativo e nitrosativo e as atividades das enzimas do sistema das glutatonas e os níveis de tiois não proteicos em córtex cerebral e/ou hipocampo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 MANUSCRITO I:

**Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) improves cholinergic signaling and protects against scopolamine-induced memory impairment in mice**

Pauline da Costa<sup>a\*</sup>, Maria Rosa C. Schetinger<sup>a</sup>, Naiara Stefanello<sup>a</sup>, Thauan F. Lopes<sup>a</sup>, Karine P. Reichert<sup>a</sup>, Charles E. Assmann<sup>a</sup>, Jucimara Baldissarelli<sup>a</sup>, Nathieli B. Bottari<sup>a</sup>, Vanessa V. Miron<sup>a</sup>, Angélica R. Casagrande<sup>a</sup>, Jessié M. Gutierrez<sup>b</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>c</sup>, Vera M. Morsch<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Post-Graduation Program in Toxicological Biochemistry, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, 97015-900, Brazil.

<sup>b</sup> Research Laboratory of Pathology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, 90050-170, RS, Brazil.

<sup>c</sup> Post-Graduation Program in Gerontology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, 97015-900, Brazil.

\*Correspondent authors: Pauline da Costa and Vera Maria Morsch; <sup>a</sup> Post-Graduation Program in Toxicological Biochemistry, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, 97015-900 Brazil. *E-mail address:* line.dct@gmail.com (Pauline da Costa) and veramorsch@gmail.com (Vera Maria Morsch)

**Abstract**

Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) is a berry rich in anthocyanins, bioactive compounds that have beneficial roles for human health-promoting due to their antioxidant and neuroprotective properties, which might prevent memory deficits. In this study, we investigated whether blackcurrant and its association with Donepezil prevent memory impairment, improving cholinergic neurotransmission and antioxidant systems in a model of amnesia induced by Scopolamine in mice. Adult male Swiss mice received saline, blackcurrant extract (50 mg/kg, oral gavage), and/or Donepezil (5 mg/kg, oral gavage), and/or Scopolamine (1 mg/kg, intraperitoneal injection). Results from behavioral tests showed that blackcurrant and/or Donepezil prevented Scopolamine-induced learning and memory deficits in mice. In the cerebral cortex and the hippocampus, Scopolamine challenged an increase in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities, besides an increase in intracellular levels of reactive species; however, blackcurrant and/or Donepezil treatments were able to prevent these Scopolamine-induced effects. In addition, Scopolamine induced inhibitory effects in the glutathione redox system; nevertheless, blackcurrant and/or Donepezil treatments prevented these changes. Also, these compounds prevented an increase in gene expression and protein density of the acetylcholinesterase enzyme and the reduction of the choline acetyltransferase enzyme gene expression in Scopolamine-induced amnesia in mice. Results suggest that blackcurrant and/or Donepezil exerted an anti-amnesic effect by modulation of the cholinergic system and improvement of redox profile. Therefore, blackcurrant might be a natural adjuvant for the prevention and treatment of memory impairment.

**Keywords:** Anthocyanins; Antioxidant; Cholinesterase; Memory; Scopolamine.



## 1. Introduction

Memory is a cognitive process responsible for the acquisition, consolidation, and recovery of learned information [1]. However, memory declines with age, and although this is a physiological process of human development, these could be associated with a variety of neurodegenerative diseases that cause dementia, such as Alzheimer's disease (AD) [2].

In fact, AD is the most common cause of dementia in elderly people. It is a multifactorial neurodegenerative disorder characterized by alterations in brain anatomy, biology, and function, leading to progressive memory deterioration, reduced cognitive capacity, and spatial disorientation [3]. The pathogenesis of AD is not completely elucidated, although the cholinergic system's involvement in memory processes is well established [4,5]

The excitatory neurotransmitter acetylcholine (ACh) has a central role in the regulation of multiple cognitive processes in the peripheral and central nervous systems (CNS), being synthesized from choline and acetyl-CoA by choline acetyltransferase (ChAT) in the cholinergic neurons and hydrolyzed by the enzymes acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) in the synaptic cleft [6]. Therefore, cholinergic dysfunction, including cholinergic neurodegeneration, changes in enzymes activity, and a decrease of ACh release in neurons have contributed for memory and learning decline associated to normal aging, neurodegenerative diseases or amnesic effects induced by drugs such as scopolamine [7,8].

Scopolamine is a tropane alkaloid that acts non-selectively as a muscarinic receptor antagonist and has multiple clinical applications, which are mainly due to its inhibitory effects on parasympathic activation [9,10]. This drug has frequently been used to induce transient memory deficits in animals, since it reduces cholinergic neurotransmission [11] and several studies have hypothesized that the administration of Scopolamine could be employed as a pharmacological model of dementia [1,12,13]. Experimental evidence has shown that the

progressive decrease of memory that occurs with aging and in neurodegenerative diseases is associated with oxidative stress [14]. Reactive species accumulation and a reduction of antioxidant defenses cause disturbances in normal cell redox signals. Accordingly, many studies have shown that oxidative stress can increase protein and lipid membrane oxidation, as well as induces DNA and mRNA damage and deplete antioxidant defenses, which leads to the apoptotic death of neurons [15,16].

Currently, pharmacological approaches available for AD patients are only used with the intention of alleviating symptoms. Some of the drugs are AChE inhibitors, such as Donepezil [17]. This drug inhibit the cholinesterases' activities, which increases ACh levels that are used in cholinergic synapses. However, the use of cholinesterase inhibitors has many limitations regarding its efficacy, tolerance, and side effects [8,18].

In this context, there are many studies that are investigating the neuroprotective potential of natural compounds in the prevention or improvement of cognitive deficits [13,19,20]. Among these, blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) berries are rich in flavonoids such as anthocyanins and are widely consumed and commercialized in cosmetics, perfumes, extracts and food products [21,22]. It has been shown that the anthocyanins exhibit many health benefits such as anti-inflammatory [23], antioxidant [24] and neuroprotective properties [25]. In addition, these phytonutrients have a high reactive species scavenger capacity [26] and could prevent decreases in antioxidant enzyme activity in dementia model [27]. Furthermore, anthocyanins may be able to modulate the activity of cholinergic enzymes in a memory deficit model [28]. These evidences suggest that flavonoids could improve memory and cognition [25]. Therefore, blackcurrant extract could be used as dietary supplementation, since is a natural compound with beneficial properties and has not been shown side effects, unlike to standard drugs [29].

Based on this background, this study aimed to investigate the possible neuroprotective properties of blackcurrant and its association with Donepezil on the memory parameters, cholinergic neurotransmission and antioxidant system in a Scopolamine-induced amnesia model in mice to find alternative approaches that could help with the prevention and treatment of cognitive impairment.

## **2. Materials and methods**

### *2.1 Animals*

All experiments were performed with male adult Swiss mice (60-days-old;  $34 \pm 0.598$  g;  $n=82$ ). The animals were maintained in plastic cages with commercial diet and water *ad libitum*, in a room under standardized conditions of temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and a 12 h light/dark cycle. The animal procedures followed the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Scientific Research Activities (DBCA). The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on the Care and Use of Animals of the Federal University of Santa Maria (protocol number 8343230616/2016).

### *2.2 Drug administration*

Scopolamine was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) and Donepezil was purchased from a local pharmacy (Santa Maria, Brazil). Blackcurrant extract was provided by Christian Hansen A/S (NutriPhy® Blackcurrant 100/40805/ Gin: 686831), which determined anthocyanins: 30% cyanidin-3-glycoside evaluated by HPLC internal method and 35% delphinidin-3-rutinoside assessed by UV- spectrophotometric method, approximately. In addition, saline solution was used as a vehicle for all compounds, which were freshly prepared before each administration. The compounds were administered at a volume of 10 mL/kg orally

for blackcurrant, Donepezil, and the vehicle, and a volume of 5 mL/kg intraperitoneally for Scopolamine.

### 2.3 Experimental design

Figure 1 shows the experimental schedule of blackcurrant, Donepezil, and Scopolamine treatments in mice to assess behavioral and biochemical parameters. After acclimatization for ten days, mice were randomly distributed into eight groups as follows: Group 1: control/saline (n=11); Group 2: 50 mg/kg blackcurrant (n=11); Group 3: 5 mg/kg Donepezil (n=8); Group 4: 50 mg/kg blackcurrant and 5 mg/kg Donepezil (n=8); Group 5: 1 mg/kg Scopolamine (n=11); Group 6: 50 mg/kg blackcurrant and 1 mg/kg Scopolamine (n=11); Group 7: 5 mg/kg Donepezil and 1 mg/kg Scopolamine (n=11); Group 8: 50 mg/kg blackcurrant, 5 mg/kg Donepezil, and 1 mg/kg Scopolamine (n=11). Blackcurrant and Donepezil were administered by oral gavage once daily and at doses of 50 mg/kg [29] and 5 mg/kg [18,30], respectively. Scopolamine was administered once daily intraperitoneally (i.p.) at a dose of 1 mg/kg [13]. The control group received the vehicle (saline) by oral gavage and/or i.p. daily. As shown in Fig. 1, animals received only blackcurrant in the first seven days. After this period, Donepezil, blackcurrant, and Scopolamine were administered for another 21 days. Blackcurrant and/or Donepezil were administered at least 30 minutes before Scopolamine administration. On the 22<sup>nd</sup> day after the beginning of treatment, the behavioral tests were performed during seven days, in the following order: Y-maze test, followed by open field and object recognition tests, and finally the inhibitory avoidance. After the 28-day experimental period, the mice were anesthetized with isoflurane inhalation and euthanized. The cerebral structures were homogenized in adequate buffers according to each neurochemical assay.

## 2.4. Behavioral tests

### 2.4.1 Y- maze test

This task was applied to evaluate spatial memory of the animals in each treatment [31]. The maze contained three arms, which were 32 cm long × 10 cm wide × 14 cm high. Each mouse was positioned at the center of the equipment and explored spontaneously all three arms over an eight-minute period, of which two minutes were of habituation and six minutes consisted of the test. The total number and sequence of arm entries were quantified. Thus, a high alternation rate (number of entries without repetition) indicates that the animals remember which arm they entered last time. The percentage of alternation was measured by the formula:  $\text{alternations \%} = (\text{number of alternations} / \text{total number of entries} - 2) \times 100$  [32].

### 2.4.2 Open field test

This test was used to evaluate the locomotor and exploratory activities of rodents [33]. The apparatus is a black square arena with 40 cm wide × 45 cm long which was subdivided into 12 equal squares. The animals were positioned individually at the open field arena to move freely and the number of crossings, rearing, total distance, and average speed for 5 min were analyzed using ANY-maze™, Stoelting CO, USA, version 6.0.

### 2.4.3 Object Recognition task

This behavioral test was performed to assess declarative memory in rodents [34]. The apparatus was used 24 h after the open field test, which also consisted in the habituation session (5 min) to this task. The vehicle, blackcurrant (50 mg / kg), or Donepezil (5 mg/ kg) treatments were performed two hours before training. In the training session, the animals were positioned in front of two identical objects (objects A1 and A2) to explore them freely for 5 min. Immediately after the training session, animals received saline (5 mL/kg, i.p.) or Scopolamine

(1 mg/kg, i.p.). Following, the test session (5 min) was performed 4 h (short-term memory) and 24 h (long-term memory) after training, when a familiar object used during training was replaced by a novel one (object A and B - 4h or C - 24h). The objects were odorless plastic blocks, similar in size and texture, but the color and shape were different for each test. The total time of exploration of objects was recorded. The results of both tests (4h and 24h after training) were evaluated by the recognition index (%):  $\text{Time in the novel object} / (\text{Time in familiar object} + \text{Time in the novel object}) \times 100$ .

#### *2.4.4 Inhibitory avoidance task*

This apparatus comprises a box with walls of acrylic, a grid metallic floor linked to an electric shock generator and a platform in the corner of the box. Mice received blackcurrant (50 mg/kg) and Donepezil (5 mg/kg) 2 h before training. In the training session, the animals were placed onto the platform and as soon as they stepped down from the platform with all four paws on the grid, a 0.5 mA for 2 s shock was applied, and stayed on the platform without stepping down until 90s. After the training session, animals received a single injection of saline (5 mL/kg, i.p.) or Scopolamine (1 mg/kg, i.p.). Then the test session was performed 24 h after training (long-term memory), but no footshock was given after stepping down. Step-down latency (300 s cut-off time) was registered as a measure of retention.

#### *2.5 AChE and BChE activity assay*

The cerebral cortex and the hippocampus were used in both AChE and BChE assays, according to [35], with modifications. The samples were homogenized in a 1:10 ratio with Tris-HCl (10 mM), after centrifuged at 1800 rpm for 10 min. Protein concentration was adjusted using the Coomassie Blue method (0.8 mg/mL) [36]. The reaction system contained 15  $\mu\text{L}$  of cerebral structure supernatant, 100 mM of phosphate buffer pH 7.5 and 10 mM DTNB. The

8mM acetylthiocholine iodide (AcSCh) or butyrylthiocholine iodide (BuSCh) were added onto microplates, and pre-incubation at 25°C for 2 min. The reaction was detected at 412 nm. The enzymes activities were expressed as mmol/h/mg of protein.

### *2.6 Intracellular reactive species (RS) production assay*

The RS levels in the cerebral cortex and the hippocampus supernatant were determined according to [37]. The 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) levels were quantified as peroxide production index in the cellular components. The DCF intensity fluorescence was measured at 525 of emission and 488 nm of excitation for 1 hour. The RS levels were expressed in  $\mu\text{M}$  DCF/mg of protein.

### *2.7 Non-protein thiols (NPSH) assay*

The NPSH levels in the cerebral cortex and the hippocampus were determined using the DTNB method according to [38], with modifications [39]. Briefly, the cerebral structures were homogenized with 10% trichloroacetic acid and centrifuged at 1050 g for 10 min. Subsequently, the supernatants were added in 1 M phosphate buffer (pH 7.4) and incubated with 10 mM DTNB. In this colorimetric assay cysteine solution was used as the reference standard. The results were detected at 412 nm and expressed as nmol NPSH/ml tissue.

### *2.8 Glutathione Reductase (GR) activity assay*

The GR activity in the cerebral cortex and the hippocampus was measured according to [40] with modifications. This assay consists on the conversion of oxidized glutathione (GSSG) to reduced glutathione (GSH) by GR, with oxidation of NADPH. The evaluation of GR activity was determined in brain supernatant (15  $\mu\text{L}$ ), which was added in system containing 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0), 2 mM EDTA, and 0,15 mM NADPH, and after was added 20 mM

GSSG. The enzyme activity was detected at 412 nm and expressed as nmol NADPH/min/mg of protein.

### *2.9 Glutathione S-transferase (GST) activity assay*

The GST activity was quantified in the cerebral cortex and hippocampus supernatant according to [41], with modifications. The reaction system contained 100 mM 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) and 100 mM GSH as substrates in 0.1 M phosphate buffer and 2,5 mM EDTA, pH 7.0. The absorbance was detected at 340 nm for 30 min and expressed as mmolCDNB/min/mg of protein.

### *2.10 Glutathione Peroxidase (GPx) activity assay*

The GPx enzyme activity in the cerebral cortex and the hippocampus was analyzed according to [42], with some modifications. The reaction mixture contained 100 mM phosphate buffer with pH 7.0, 10 mM GSH, 2mM NADPH, 100 mM sodium azide, 50 U/2mL GR, and 10  $\mu$ L homogenate. In this assay, GPx catalyzes the GSH oxidation and the GSSG is instantly converted to the reduced form by GR and in the presence of NADPH. The enzymatic activity was indirectly quantified by NADPH oxidation and the decrease was measured at 340 nm. The data was expressed as nmol NADPH/min/mg of protein.

### *2.11 Analysis of gene expression of AChE and ChAT enzymes using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)*

The gene expression analysis was performed using qRT-PCR analysis to investigate the modulation of *AChE* and *ChAT* enzymes genes expression in the hippocampus and the cerebral cortex following a method that was previously published [43]. First, total RNA was isolated with TRIzol<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific, USA) and its concentration was measured at 260 nm.



After, the RNA (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) underwent treatment with DNase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 37°C for 5 min, and heating at 65°C for 10 min. Reverse transcription to cDNA was performed using 4  $\mu\text{L}$  of iScript Mix and 1  $\mu\text{L}$  of iScript enzyme (Bio-Rad Laboratories, USA). The steps of reaction were: heating at 25 °C for 5 min, at 42°C for 30 min, and at 85°C for 5 min and incubation at 5°C for 60 min. Finally, a qRT-PCR reaction was performed in a final volume of 20  $\mu\text{L}$  using the QuantiFast SYBR® Green PCR Kit in Rotor-Gene Q equipment (Qiagen, Germany). Gene expression was normalized using the  $\beta$ -actin gene as the housekeeping control. Primer sequences used were described in table 1.

### 2.12 Western Blot analysis

The AChE density in the cerebral cortex and the hippocampus were assessed using Western blot as previously published [44]. The samples were homogenized in ice-cold RIPA buffer with protease and phosphatase inhibitors. The protein concentration was measured with the BCA Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich, EUA). Aliquots underwent electrophoresis in a SDS-polyacrylamide gel, and after electrotransferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, UK). The membranes were blocked with 5% BSA in 0.1% TBS-T for 1 h and, then were incubated with the primary antibody anti-AChE (1:200, Santa Cruz Biotechnology) overnight at 4°C. Subsequently, the secondary antibodies (1:10000) were applied for 90 min. Western blots were carried out with enhanced chemi-fluorescent substrate using Amersham Imager 600 (GEHealthcare Life Sciences, EUA). Data analyzed for concentration of proteins were normalized using the actin, as described by [45], with modifications.

### 2.13 Statistical analysis

Data normality was verified using a Shapiro-Wilk test. The statistical analysis of the results were performed two-way ANOVA tests using Tukey *post-hoc* tests for multiple

comparisons. Values of F and P were presented in Table 5. The GraphPad Prism statistical software (version 7.00) was used for these analyses. All samples were run in triplicate. Data were expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) or median  $\pm$  interquartile ranges for step-down latencies. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

### **3. Results**

#### *3.1. Blackcurrant prevents memory damage induced by Scopolamine administration in mice*

Figure 2 shows the effect of blackcurrant and/or Donepezil on the spatial memory of Scopolamine-treated mice in the Y-maze apparatus. Statistical analysis indicated that Scopolamine administration significantly decreased the percentage of alternation (20%, Fig. 2A) in the Scopolamine/saline group when compared with control/saline group ( $P < 0.0001$ ). Alternatively, treatment with blackcurrant and/or Donepezil increased the percentage of alternation when compared to the Scopolamine/saline group ( $P < 0.05$ ).

#### *3.2 Blackcurrant restores the object recognition memory impairment induced by Scopolamine in mice*

Statistical analysis of open field data (Table 2) indicated that the administration of Scopolamine, blackcurrant, and Donepezil did not significantly alter the number of crossings, rearings, total distance traveled, and average speed in any experimental group ( $P > 0.05$ ). Figure 3 shows the evaluation of spatial memory in the object recognition task. In the training session (Fig. 3A), the groups exhibited no significant differences in the time spent exploring two identical objects. In addition, Scopolamine administration significantly decreased the recognition index in the STM (15%, Fig. 3B) and LTM (18%, Fig. 3C) in the Scopolamine/saline group when compared with control/saline group ( $P < 0.05$ ). Mice treated

with blackcurrant and/or Donepezil had significantly higher recognition indexes for STM and LTM when compared to the Scopolamine/saline group ( $P < 0.05$ ).

### *3.3 Blackcurrant treatment prevents memory deficits induced by Scopolamine in the inhibitory avoidance task*

In the training session for the inhibitory avoidance test no significant differences in the step-down latency between groups was observed (Fig. 4A). Statistical analysis of this test demonstrated a significant decrease in the step-down latency (36%, Fig 4B) in the Scopolamine/saline group when compared with control/saline group ( $P < 0.05$ ). The blackcurrant and Donepezil treatments were able to significantly increase the step-down latency when compared to the Scopolamine/saline group ( $P < 0.05$ ).

### *3.4 Blackcurrant prevents the increase in AChE and BChE enzymes activities in the cerebral cortex and the hippocampus of Scopolamine-induced mice*

In Figure 5, we investigated the effect of the blackcurrant and Donepezil treatment on AChE and BChE activities in different brain structures of Scopolamine-induced mice. The statistical analysis indicated that Scopolamine significantly increased AChE activity in the cerebral cortex (34%, Fig. 5A) and the hippocampus (42%, Fig. 5B) in the Scopolamine/saline group when compared with control/saline group ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively). In addition, BChE activity increased in the cerebral cortex (29%, Fig. 5C) and the hippocampus (46%, Fig. 5D) in the Scopolamine/saline group when compared with control/saline group ( $P < 0.05$ ). The blackcurrant and/or Donepezil treatments prevented an increase in AChE activity in all different brain structures analyzed when compared to the Scopolamine/saline group ( $P < 0.05$ ). Moreover, BChE activity increases in the cerebral cortex was abolished in groups treated with blackcurrant alone and its association with Donepezil. However, only the association of

blackcurrant with Donepezil prevented an increase in BChE activity in the hippocampus when compared to the Scopolamine/saline group ( $P < 0.05$ ).

### *3.5 Blackcurrant restores the increase in RS production and prevents the inhibitory effects in the glutathione redox system in Scopolamine-induced mice brains*

The results of RS and NPSH levels, as well as GR, GST, and GPx enzymes activity in the cerebral cortex and the hippocampus, are presented in Tables 3 and 4, respectively. Statistical analysis of RS levels showed that the Scopolamine administration caused a significant increase in RS levels in the cerebral cortex (55%) and the hippocampus (37%) in the Scopolamine/saline group when compared with control/saline group ( $P < 0.0001$  and  $P < 0.01$  respectively). The blackcurrant and/or Donepezil treatment prevented these effects in the cerebral cortex, but only the treatment with Donepezil alone and blackcurrant with Donepezil concomitantly prevented an increase in RS levels in the hippocampus when compared to the Scopolamine/saline group ( $P < 0.05$ ). In addition, the two-way ANOVA analysis on the cerebral cortex and the hippocampus demonstrated that Scopolamine administration caused a significant decrease in NPSH (8% and 11%, respectively) levels, and a decrease in GR (19% and 16%, respectively), GST (28% and 16%, respectively) and GPx (35% and 29%, respectively) enzymes activities in the Scopolamine/saline group when compared with control/saline group ( $P < 0.05$ ). The blackcurrant and/or Donepezil treatments were able to prevent these reductions ( $P < 0.05$ ) when compared to the Scopolamine/saline group ( $P < 0.05$ ). However, the NPSH levels in the hippocampus were restored only in the group treated with blackcurrant when compared to the Scopolamine/saline group ( $P < 0.05$ ). Moreover, for the GPx activity in cerebral cortex no significant differences in the group treated with blackcurrant/Scopolamine ( $P > 0.05$ ).

### 3.6 Blackcurrant prevents changes in AChE and ChAT gene expression in the brain tissue of Scopolamine-induced mice

Figure 6 shows the effect of treatment with blackcurrant and Donepezil treatment on the expression of AChE and ChAT genes obtained by qRT-PCR in the cerebral cortex and the hippocampus. The statistical analysis on the cerebral cortex (Fig. 6A) and the hippocampus (Fig. 6B) demonstrated that Scopolamine administration caused an increase (47% and 36%, respectively) in AChE expression in the Scopolamine/saline group when compared with control/saline group ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05\%$ , respectively). In addition, ChAT expression decreased (84%, Fig. 6D) in the hippocampus of the Scopolamine/saline group when compared with the control/saline group ( $P < 0.05$ ). No significant differences were observed on the ChAT expression in the cerebral cortex ( $P > 0.05$ ; Fig. 6C). However, the blackcurrant and/or Donepezil treatments prevented an increase in AChE expression in the cerebral cortex. The blackcurrant and Donepezil combination also decreased the AChE and ChAT expression in the hippocampus when compared to the Scopolamine/saline group ( $P < 0.05$ ).

### 3.7 Blackcurrant prevents the increase in AChE density in the cerebral cortex and the hippocampus in Scopolamine-induced mice

The results of AChE density in the cerebral cortex and the hippocampus from the Western blot analysis are presented in Figure 7. *Post hoc* comparisons on the cerebral cortex (Fig. 7A) demonstrated that Scopolamine administration caused a significant increase in AChE density (30%) in the Scopolamine/saline group when compared with control/saline group ( $P < 0.001$ ). In the hippocampus (Fig. 7B), a significant increase in AChE density was observed in all Scopolamine-induced groups (group 5: 79%; group 6: 64%; group 8: 56%; and group 9: 52%) when compared with control/saline group ( $P < 0.0001$ ). The blackcurrant and/or Donepezil treatments were able to prevent this increase in AChE density in the cerebral cortex

when compared to the Scopolamine/saline group ( $P < 0.05$ ). Also, a significant reduction was observed in the blackcurrant, Donepezil, and Scopolamine group when compared to the control/saline group ( $P < 0.05$ ). The increase of AChE density in the hippocampus was attenuated in the treatment with Donepezil, and blackcurrant associated to Donepezil when compared to the Scopolamine/saline group ( $P < 0.05$ ).

#### **4. Discussion**

In the current investigation, we evaluated the neuroprotective effects of blackcurrant on cognitive deficits, cholinergic neurotransmission and oxidative damage using a Scopolamine-induced amnesia model in mice. Moreover, this study is the first to compare the effects of blackcurrant to the standard drug Donepezil and also to determine whether the combination of both treatments could ameliorate the impairments that are induced by Scopolamine.

Some behavioral tests were applied in this study to assess different types of memory and others cognitive functions in rodents, such as Y-maze, object recognition, inhibitory avoidance and open field, which are widely used in the validation for cognitive dysfunctions and evaluation of pharmacological interventions in the memory processing [10,12]. Our results demonstrated that chronic Scopolamine injection caused damage in the spatial working memory in the Y-maze test. Moreover, Scopolamine also induced deficits in short and long-term memory in the object recognition task and exhibited damage to long-term memory acquisition in the inhibitory avoidance test. These findings are consistent with prior studies which showed that Scopolamine can induce impairments at different phases of memory acquisition in rodents [10,12,19]. These progressive cognitive deficits occur due to a blockade of cholinergic muscarinic receptors, mainly the M1 type, disrupting cholinergic transmission, leading to damage in the cortex and the hippocampus, brain regions essential for learning and memory [10,46].

Regarding blackcurrant treatment, the results indicated that blackcurrant alone and its association with Donepezil reduced the total arm entries and increased the percentage of alternation in the spontaneous behavior Y-maze test. It also increased the object recognition index in the STM and LTM, which is similar to what occurred in the administration of a dose of 5 mg/kg of Donepezil. The combination of blackcurrant with Donepezil also prevented a reduction in the step-down latencies of the inhibitory avoidance induced by Scopolamine. These results indicated that blackcurrant and/or donepezil treatments prevented cognitive impairment induced by Scopolamine. Additionally, the experimental conditions used in the present study did not alter exploratory and locomotor activities because the mice presented a similar number of crossings and rearing, total traveled distance, and average speed in the open field test.

Some studies have shown that anthocyanins are major flavonoids in blackcurrant, around of 250 mg of anthocyanins/100g fresh fruits [22]. High-content phenolic compounds present in blackcurrant are cyanidine 3-glucoside and delphinidin 3-rutinoside anthocyanins, which are able to cross the blood-brain barrier and counteract pathological events at the CNS [29,47]. In agreement with our results, previous works observed that the administration of anthocyanin-rich berries in animal models protected and even reversed age-induced declines in brain function such as those in learning, memory, attention, and motor performance [25,29,30]. Treatments with 200 mg/kg of anthocyanins from grape skin restored memory deficits streptozotocin-induced observed in the object recognition test [27] and inhibitory avoidance task in rats [20]. In addition, blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) extract or vinegar and Donepezil (5 mg/kg) alone ameliorated spontaneous alternation behavior after a single injection of Scopolamine in the Y- maze test [30].

Cognitive deficits that occur with aging and the early stages of dementias are associated with an imbalance in the cholinergic system [48]. Biochemical alterations in the enzymes involved in ACh synthesis or hydrolysis have been considered an important pathophysiology

parameter in many diseases [7,49,50]. In our study, Scopolamine administration increased AChE and BChE enzymes activities, as well as gene expression and protein density of AChE in the cerebral cortex and the hippocampus, and caused a reduction of ChAT expression in the hippocampus [13,30,51]. These alterations may decrease ACh cerebral levels in mice, which cause cognitive dysfunction [51].

Alternatively, treatment with blackcurrant and its association with Donepezil effectively prevented the increase AChE activity in both cerebral structures. Donepezil administration also inhibited this enzyme, which was expected since this drug is a reversible AChE inhibitor and it was developed to improve memory by maintaining ACh levels by decreasing its breakdown rate [52]. The Donepezil structure has an indanone moiety and an N-benzylpiperidine subunit, and in this subunit both the benzoyl containing functionality and the piperidine moiety are the key features for the binding and inhibitory effects of AChE [53]. The benzyl group interacts with tryptophan residues (Trp84), at the bottom of the enzyme catalytic cavity and piperidine interacts with tyrosine residues (Tyr70) at the peripheral anion site [53]. The AChE inhibitors play a crucial role in mild to moderate AD, but this therapeutic effect is partial and the number of non-responder patients is large [8]. In view that, alternative anti-amnesic therapies need to be assessed.

Another important enzyme is BChE, which has been described as a detoxification enzyme, and might also co-regulate the cholinergic transmission. This enzyme has little substrate selectivity and can also hydrolyze ACh, suggesting that the inhibition of BChE activity may improve cholinergic neurotransmission [18,54]. Blackcurrant and its association with Donepezil decreased BChE activity in the cerebral cortex. In the hippocampus, the combination of blackcurrant and Donepezil also prevented the effects induced by Scopolamine. Nevertheless, Donepezil treatment did not significantly decrease BChE activity in the analyzed structures since this drug is selective for AChE and not for BChE [55].



Furthermore, treatment with blackcurrant and/or Donepezil also prevented increases in gene expression and protein densities of AChE in different brain structures of Scopolamine-induced animals. In the cerebral cortex, only the association prevented an increase in AChE expression. Our study also indicated that treatment with blackcurrant and its association with Donepezil effectively prevent the decreased ChAT expression in the hippocampus. Interestingly, previous study showed that the activity and expression of ChAT is higher in the hippocampus, demonstrating that different brain regions have heterogeneity in the quantity of cholinergic neurons and its projections, which may result in distinct responses [33,54,56,57]. Thus, previous studies revealed that an increase in ACh levels is a strategy commonly employed in the treatment of dementia symptoms [30,51].

Although the amnesic effects caused by Scopolamine are due to a reduction in cholinergic neurotransmission, it can also trigger non-cholinergic effects, such as oxidative stress induction in the brain, which can contribute to the amnesia etiology [58]. Our results showed that RS levels were increased by Scopolamine in the cerebral cortex and the hippocampus. These findings corroborate with published data that revealed an increase in RS levels in the brain and serum of Scopolamine-induced mice [59]. Therefore, the excessive production of RS is considered a risk factor to neurodegeneration progression because it can promote brain and other neural tissue damage [60]. These oxidant agents induce biochemical cascades that lead to caspase activation and the release of cytochrome c, which induce nuclear DNA condensation and fragmentation, resulting in premature cell apoptosis [61].

Additionally, cellular antioxidant defense systems alterations were evidenced by inhibition of GR, GST, and GPx activities and decreased NPSH levels in the cerebral cortex and the hippocampus of Scopolamine-induced mice. Scopolamine administration caused an impairment in redox homeostasis since reduced glutathione (GSH) levels [23], which comprise the majority of non-protein thiols of cells and is responsible for free radical species

neutralization and protection against oxidative damage in the cerebral structures [62,63]. Besides, GR enzyme regenerates GSH, while the GPx and GST act in the detoxification of cells from hydrogen peroxide and xenobiotics, respectively, contributing to the reduction of oxidative stress [62]. In this context, the antioxidant enzymes' activities represent important biomarkers for the investigation of cognitive ability [30,59]. Our data are consistent with other studies that have revealed a decrease in the glutathione redox system, which may impair RS removal, triggering alterations in the biological membranes [27,29]. Therefore, it is strongly enveloped in the progressive decline of cognition related with aging and neurodegenerative disorders [59].

Another beneficial property of blackcurrant is its potent antioxidant effect. The present results showed that the blackcurrant and/or Donepezil treatment was able to significantly decrease RS levels in the cerebral cortex and the hippocampus. Besides, blackcurrant administration alone also prevented an increase in RS levels induced by Scopolamine in the cerebral cortex. Several authors highlighted the use of natural antioxidant therapeutic agents in the treatment of amnesia [13,27,29,30]. Flavonols from blackcurrant, particularly anthocyanins, have the capacity to scavenge free radicals, since its chemical structure with the hydroxyl groups around the pyrone ring donate hydrogen atoms to free radicals [27].

In addition, anthocyanins also inhibit pro-oxidant effects by inducing antioxidant enzyme activity [64,65]. Our results showed that blackcurrant treatment prevented the decrease GR and GST activities, as well as NPSH levels in the cerebral cortex and the hippocampus of Scopolamine-induced mice. The blackcurrant and Donepezil combination also prevented decreased GPx activity in the hippocampus. Experimental studies also revealed that treatment with anthocyanins prevented the inhibition of GPx, GR, and GST enzymes activities and other antioxidant enzymes in the brain of animals for several models of AD [27,30,31]. Taken together, the removal of free radicals and the stimulation of the glutathione redox system

prevented oxidative stress induced by Scopolamine, which provides evidence for the neuroprotective effects of blackcurrant [30,31].

Similarly, treatment with Donepezil also showed antioxidant potential, since it restored the RS levels, prevented the inhibition of GR, GST, and GPx activities in the cerebral cortex and the hippocampus, and restored the NPSH levels in the cerebral cortex. According to a previous study, Donepezil also improves redox homeostasis in AD, but the mechanisms involved are still unclear. It is suggested that the therapeutic efficacy of Donepezil besides the inhibition of AChE activity, may be due to with apparent antioxidant and anti-apoptotic properties [53,66,67]. Based on the present results, the behavioral outcomes indicate that blackcurrant and/or Donepezil treatment prevented cognitive impairments in the acquisition and consolidation of memory, since they improved cholinergic enzyme dysfunction and protected against oxidative damage induced by Scopolamine in mice. However, further detailed studies are required to explain others mechanisms of action of blackcurrant and its bioactive molecules.

## **Conclusion**

In conclusion, the results of this study suggest that treatment with blackcurrant, which is rich in anthocyanins and other phenolic compounds, promotes anti-amnesic effects in a Scopolamine-induced memory impairment model, as shown by its important beneficial effects on the cognitive and behavioral parameters, and antioxidant activity. Similar beneficial effects are found in the treatment with the standard drug Donepezil and especially, when there is a combination of both treatments. Thus, our study opens new perspectives for a promising therapeutic potential of blackcurrant in the prevention and treatment of memory loss induced by drugs, aging or neurodegenerative-related diseases.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to UFSM, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROEX - process number: 23028.004173/2019-93), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- grant number: 306238/2017-9), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS/PRONEX - grant number: 16/2551-0000499-4) and Christian Hansen LTDA.

**Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflicts of interest.

## References

- [1] M. Moosavi, R. SoukhakLari, L. Moezi, F. Pirsalami, Scopolamine-induced passive avoidance memory retrieval deficit is accompanied with hippocampal MMP2, MMP-9 and MAPKs alteration, *Eur J Pharmacol.* 819 (2018) 248–253. doi:10.1016/j.ejphar.2017.12.007.
- [2] A.C. Hamdan, Avaliação neuropsicológica na doença de Alzheimer e no comportamento cognitivo leve, *Psicol. Argum.* . 26 (2008) 183–192.
- [3] K. Ubhi, E. Masliah, Alzheimer’s disease: recent advances and future perspectives, *J Alzheimers Dis.* 33 Suppl 1 (2013) S185-94. doi:10.3233/JAD-2012-129028.
- [4] M.G. Blake, M.C. Krawczyk, C.M. Baratti, M.M. Boccia, Neuropharmacology of memory consolidation and reconsolidation: Insights on central cholinergic mechanisms, *J Physiol Paris.* 108 (2014) 286–291. doi:10.1016/j.jphysparis.2014.04.005.
- [5] M. Singh, M. Kaur, H. Kukreja, R. Chugh, O. Silakari, D. Singh, Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection, *Eur. J. Med. Chem.* (2013). doi:10.1016/j.ejmech.2013.09.050.
- [6] H. Soreq, S. Seidman, Acetylcholinesterase--new roles for an old actor, *Nat Rev Neurosci.* 2 (2001) 294–302. doi:10.1038/35067589.
- [7] R.T. Bartus, On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis, *Exp Neurol.* 163 (2000) 495–529. doi:10.1006/exnr.2000.7397.
- [8] G. Pepeu, M.G. Giovannini, Cholinesterase inhibitors and memory, *Chem Biol Interact.* 187 (2010) 403–408. doi:10.1016/j.cbi.2009.11.018.
- [9] S.L. Cao, Q.Z. Zhang, X.G. Jiang, Preparation of ion-activated in situ gel systems of scopolamine hydrobromide and evaluation of its antimotion sickness efficacy, *Acta Pharmacol Sin.* 28 (2007) 584–590. doi:10.1111/j.1745-7254.2007.00540.x.

- [10] I. Klinkenberg, A. Blokland, The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies, *Neurosci Biobehav Rev.* 34 (2010) 1307–1350. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.04.001.
- [11] H.S. Lim, B.Y. Kim, Y.J. Kim, S.J. Jeong, Phytochemical allylguaiacol exerts a neuroprotective effect on hippocampal cells and ameliorates scopolamine-induced memory impairment in mice, *Behav Brain Res.* 339 (2018) 261–268. doi:10.1016/j.bbr.2017.11.003.
- [12] P.H. Botton, M.S. Costa, A.P. Ardais, S. Mioranza, D.O. Souza, J.B. da Rocha, L.O. Porciuncula, Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice, *Behav Brain Res.* 214 (2010) 254–259. doi:10.1016/j.bbr.2010.05.034.
- [13] H.R. Park, H. Lee, H. Park, W.K. Cho, J.Y. Ma, Fermented Sipjeondaebotang Alleviates Memory Deficits and Loss of Hippocampal Neurogenesis in Scopolamine-induced Amnesia in Mice, *Sci Rep.* 6 (2016) 22405. doi:10.1038/srep22405.
- [14] D.A. Butterfield, M. Perluigi, R. Sultana, Oxidative stress in Alzheimer's disease brain: new insights from redox proteomics, *Eur J Pharmacol.* 545 (2006) 39–50. doi:10.1016/j.ejphar.2006.06.026.
- [15] D.J. Betteridge, What is oxidative stress?, *Metabolism.* 49 (2000) 3–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10693912>.
- [16] W.J. Huang, X. Zhang, W.W. Chen, Role of oxidative stress in Alzheimer's disease, *Biomed Rep.* 4 (2016) 519–522. doi:10.3892/br.2016.630.
- [17] Z.M. Wang, P. Cai, Q.H. Liu, D.Q. Xu, X.L. Yang, J.J. Wu, L.Y. Kong, X.B. Wang, Rational modification of donepezil as multifunctional acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease, *Eur. J. Med. Chem.* (2016). doi:10.1016/j.ejmech.2016.07.052.
- [18] P. Barai, N. Raval, S. Acharya, N. Acharya, Neuroprotective effects of *Bergenia ciliata* on NMDA induced injury in SH-SY5Y cells and attenuation of cognitive deficits in scopolamine induced amnesia in rats, *Biomed. Pharmacother.* (2018). doi:10.1016/j.biopha.2018.09.011.
- [19] J. Li, L. Gao, K. Sun, D. Xiao, W. Li, L. Xiang, J. Qi, Benzoate fraction from *Gentiana rigescens* Franch alleviates scopolamine-induced impaired memory in mice model in vivo, *J Ethnopharmacol.* 193 (2016) 107–116. doi:10.1016/j.jep.2016.08.001.
- [20] J.M. Gutierrez, F.B. Carvalho, M.R. Schetinger, P. Marisco, P. Agostinho, M. Rodrigues, M.A. Rubin, R. Schmatz, C.R. da Silva, P.C.G. de, J.G. Farias, C. Signor, V.M. Morsch, C.M. Mazzanti, M. Bogo, C.D. Bonan, R. Spanevello, Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type, *Life Sci.* 96 (2014) 7–17. doi:10.1016/j.lfs.2013.11.014.
- [21] A. Gopalan, S.C. Reuben, S. Ahmed, A.S. Darvesh, J. Hohmann, A. Bishayee, The health benefits of blackcurrants, *Food Funct.* 3 (2012) 795–809. doi:10.1039/c2fo30058c.

- [22] M. Vagiri, S. Conner, D. Stewart, S.C. Andersson, S. Verrall, E. Johansson, K. Rumpunen, Phenolic compounds in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves relative to leaf position and harvest date, *Food Chem.* 172 (2015) 135–142. doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.041.
- [23] T. Benn, B. Kim, Y.K. Park, C.J. Wegner, E. Harness, T.G. Nam, D.O. Kim, J.S. Lee, J.Y. Lee, Polyphenol-rich blackcurrant extract prevents inflammation in diet-induced obese mice, *J Nutr Biochem.* 25 (2014) 1019–1025. doi:10.1016/j.jnutbio.2014.05.008.
- [24] N. Jia, B. Kong, Q. Liu, X. Diao, X. Xia, Antioxidant activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract and its inhibitory effect on lipid and protein oxidation of pork patties during chilled storage, *Meat Sci.* 91 (2012) 533–539. doi:10.1016/j.meatsci.2012.03.010.
- [25] N.M. dos Santos, P.B. Batista, Â.G. Batista, M.R. Maróstica, Current evidence on cognitive improvement and neuroprotection promoted by anthocyanins, *Curr. Opin. Food Sci.* (2019). doi:10.1016/j.cofs.2019.03.008.
- [26] M.P. Kahkonen, M. Heinonen, Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons, *J Agric Food Chem.* 51 (2003) 628–633. doi:10.1021/jf025551i.
- [27] S.M. Pacheco, M.S.P. Soares, J.M. Gutierrez, M.F.B. Gerzson, F.B. Carvalho, J.H. Azambuja, M.R.C. Schetinger, F.M. Stefanello, R.M. Spanevello, Anthocyanins as a potential pharmacological agent to manage memory deficit, oxidative stress and alterations in ion pump activity induced by experimental sporadic dementia of Alzheimer's type, *J Nutr Biochem.* 56 (2018) 193–204. doi:10.1016/j.jnutbio.2018.02.014.
- [28] J.M. Gutierrez, F.B. Carvalho, M.R. Schetinger, P. Agostinho, P.C. Marisco, J.M. Vieira, M.M. Rosa, C. Bohnert, M.A. Rubin, V.M. Morsch, R. Spanevello, C.M. Mazzanti, Neuroprotective effect of anthocyanins on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia in rats, *Int J Dev Neurosci.* 33 (2014) 88–97. doi:10.1016/j.ijdevneu.2013.12.006.
- [29] P.H. Shih, Y.C. Chan, J.W. Liao, M.F. Wang, G.C. Yen, 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.* 21 (2010) 598–605. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.03.008.
- [30] S.M. Hong, K.H. Soe, T.H. Lee, I.S. Kim, Y.M. Lee, B.O. Lim, Cognitive Improving Effects by Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Vinegar on Scopolamine-Induced Amnesia Mice Model, *J Agric Food Chem.* 66 (2018) 99–107. doi:10.1021/acs.jafc.7b03965.
- [31] M.D. Teixeira, C.M. Souza, A.P. Menezes, M.R. Carmo, A.A. Fonteles, J.P. Gurgel, F.A. Lima, G.S. Viana, G.M. Andrade, Catechin attenuates behavioral neurotoxicity induced by 6-OHDA in rats, *Pharmacol Biochem Behav.* 110 (2013) 1–7. doi:10.1016/j.pbb.2013.05.012.
- [32] J. Chu, P.F. Giannopoulos, C. Ceballos-Diaz, T.E. Golde, D. Pratico, Adeno-associated virus-mediated brain delivery of 5-lipoxygenase modulates the AD-like phenotype of APP mice, *Mol. Neurodegener.* (2012). doi:10.1186/1750-1326-7-1.

- [33] P. da Costa, J.F. Gonçalves, J. Baldissarelli, T.R. Mann, F.H. Abdalla, A.M. Fiorenza, M.M. da Rosa, F.B. Carvalho, J.M. Gutierrez, C.M. de Andrade, M.A. Rubin, M.R.C. Schetinger, V.M. Morsch, Curcumin attenuates memory deficits and the impairment of cholinergic and purinergic signaling in rats chronically exposed to cadmium, *Environ. Toxicol.* 32 (2017). doi:10.1002/tox.22213.
- [34] J.C. Dodart, C. Mathis, A. Ungerer, Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice, *Neuroreport.* 8 (1997) 1173–1178. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9175108>.
- [35] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres Jr., R.M. Feather-Stone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem Pharmacol.* 7 (1961) 88–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13726518>.
- [36] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.* 72 (1976) 248–254. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>.
- [37] F. Perez-Severiano, A. Santamaria, J. Pedraza-Chaverri, O.N. Medina-Campos, C. Rios, J. Segovia, Increased formation of reactive oxygen species, but no changes in glutathione peroxidase activity, in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation, *Neurochem Res.* 29 (2004) 729–733. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15098934>.
- [38] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch Biochem Biophys.* 82 (1959) 70–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13650640>.
- [39] M.Y. Aksenov, W.R. Markesbery, Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease, *Neurosci Lett.* 302 (2001) 141–145. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11290407>.
- [40] I. Carlberg, B. Mannervik, [59] Glutathione reductase, *Methods Enzymol.* (1985). doi:10.1016/S0076-6879(85)13062-4.
- [41] W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby, Glutathione S-transferase AA from rat liver, *Arch Biochem Biophys.* 175 (1976) 710–716. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/958327>.
- [42] D.E. Paglia, W.N. Valentine, Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *J Lab Clin Med.* 70 (1967) 158–169. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6066618>.
- [43] C.E. Assmann, C.F. Cadoná, B. da S.R. Bonadiman, E.B. Dornelles, G. Trevisan, I.B.M. da Cruz, Tea tree oil presents in vitro antitumor activity on breast cancer cells without cytotoxic effects on fibroblasts and on peripheral blood mononuclear cells, *Biomed. Pharmacother.* 103 (2018) 1253–1261.
- [44] K.P. Reichert, M.R.C. Schetinger, J.M. Gutierrez, L.P. Pelinson, N. Stefanello, D.P. Dalenogare, J. Baldissarelli, T.F. Lopes, V.M. Morsch, Lingonberry Extract Provides Neuroprotection by Regulating the Purinergic System and Reducing Oxidative Stress in Diabetic Rats, *Mol. Nutr. Food Res.* (2018). doi:10.1002/mnfr.201800050.

- [45] N. Rebola, P.C. Pinheiro, C.R. Oliveira, J.O. Malva, R.A. Cunha, Subcellular localization of adenosine A(1) receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus, *Brain Res.* 987 (2003) 49–58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14499945>.
- [46] J.C. Soares, R. V Fornari, M.G. Oliveira, Role of muscarinic M1 receptors in inhibitory avoidance and contextual fear conditioning, *Neurobiol Learn Mem.* 86 (2006) 188–196. doi:10.1016/j.nlm.2006.02.006.
- [47] S. Vepsäläinen, H. Koivisto, E. Pekkarinen, P. Mäkinen, G. Dobson, G.J. McDougall, D. Stewart, A. Haapasalo, R.O. Karjalainen, H. Tanila, M. Hiltunen, 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.* 24 (2013) 360–370. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.07.006.
- [48] R. V Fornari, K.M. Moreira, M.G. Oliveira, Effects of the selective M1 muscarinic receptor antagonist dicyclomine on emotional memory, *Learn Mem.* 7 (2000) 287–292. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11040260>.
- [49] C.R.N. Polachini, R.M. Spanevello, E.A. Casali, D. Zanini, L.B. Pereira, C.C. Martins, J. Baldissareli, A.M. Cardoso, M.F. Duarte, P. da Costa, A.L.C. Prado, M.R.C. Schetinger, V.M. Morsch, Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis, *Neuroscience.* 266 (2014). doi:10.1016/j.neuroscience.2014.01.048.
- [50] N. Mushtaq, R. Schmatz, M. Ahmed, L.B. Pereira, P. da Costa, K.P. Reichert, D. Dalenogare, L.P. Pelinson, J.M. Vieira, N. Stefanello, L.S. de Oliveira, N. Mulinacci, M. Bellumori, V.M. Morsch, M.R. Schetinger, Protective effect of rosmarinic acid against oxidative stress biomarkers in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats, *J. Physiol. Biochem.* 71 (2015). doi:10.1007/s13105-015-0438-4.
- [51] C. Guo, J. Shen, Z. Meng, X. Yang, F. Li, Neuroprotective effects of polygalacic acid on scopolamine-induced memory deficits in mice, *Phytomedicine.* 23 (2016) 149–155. doi:10.1016/j.phymed.2015.12.009.
- [52] P. Atukeren, M. Cengiz, H. Yavuzer, R. Gelisgen, E. Altunoglu, S. Oner, F. Erdenen, D. Yuceakin, H. Deric, U. Cakatay, H. Uzun, The efficacy of donepezil administration on acetylcholinesterase activity and altered redox homeostasis in Alzheimer's disease, *Biomed Pharmacother.* 90 (2017) 786–795. doi:10.1016/j.biopha.2017.03.101.
- [53] A. Saxena, J.M. Fedorko, C.R. Vinayaka, R. Medhekar, Z. Radic, P. Taylor, O. Lockridge, B.P. Doctor, Aromatic amino-acid residues at the active and peripheral anionic sites control the binding of E2020 (Aricept) to cholinesterases, *Eur J Biochem.* 270 (2003) 4447–4458. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14622273>.
- [54] M.M. Mesulam, A. Guillozet, P. Shaw, A. Levey, E.G. Duysen, O. Lockridge, Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine, *Neuroscience.* 110 (2002) 627–639. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11934471>.



- [55] C.H. da Silva, V.L. Campo, I. Carvalho, C.A. Taft, Molecular modeling, docking and ADMET studies applied to the design of a novel hybrid for treatment of Alzheimer's disease, *J Mol Graph Model*. 25 (2006) 169–175. doi:10.1016/j.jmglm.2005.12.002.
- [56] A. Das, M. Dikshit, C. Nath, Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age, *Life Sci*. 68 (2001) 1545–1555. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11253171>.
- [57] W.R. Hawley, C.F. Witty, J.M. Daniel, G.P. Dohanich, Choline acetyltransferase in the hippocampus is associated with learning strategy preference in adult male rats, *Behav. Brain Res*. 289 (2015) 118–124. doi:10.1016/j.bbr.2015.04.034.
- [58] B. Budzynska, A. Boguszewska-Czubara, M. Kruk-Sl6mka, K. Skalicka-Wozniak, A. Michalak, I. Musik, G. Biala, Effects of imperatorin on scopolamine-induced cognitive impairment and oxidative stress in mice, *Psychopharmacol*. 232 (2015) 931–942. doi:10.1007/s00213-014-3728-6.
- [59] J.S. Lee, H.G. Kim, J.M. Han, D.W. Kim, M.H. Yi, S.W. Son, Y.A. Kim, J.S. Lee, M.K. Choi, C.G. Son, Ethanol extract of *Astragali Radix* and *Salviae Miltiorrhizae Radix*, Myelophil, exerts anti-amnesic effect in a mouse model of scopolamine-induced memory deficits, *J Ethnopharmacol*. 153 (2014) 782–792. doi:10.1016/j.jep.2014.03.048.
- [60] A. Nunomura, [Oxidative stress hypothesis for Alzheimer's disease and its potential therapeutic implications], *Rinsho Shinkeigaku*. 53 (2013) 1043–1045. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24291874>.
- [61] L. Annunziato, S. Amoroso, A. Pannaccione, M. Cataldi, G. Pignataro, A. D'Alessio, R. Sirabella, A. Secondo, L. Sibaud, G.F. Di Renzo, Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions, *Toxicol Lett*. 139 (2003) 125–133. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12628748>.
- [62] S.C. Lu, Glutathione synthesis, *Biochim Biophys Acta*. 1830 (2013) 3143–3153. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.008.
- [63] N. Couto, J. Wood, J. Barber, The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network, *Free Radic Biol Med*. 95 (2016) 27–42. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028.
- [64] S.U. Rehman, S.A. Shah, T. Ali, J. Il Chung, M.O. Kim, Anthocyanins Reversed D-Galactose-Induced Oxidative Stress and Neuroinflammation Mediated Cognitive Impairment in Adult Rats, *Mol. Neurobiol*. (2017). doi:10.1007/s12035-015-9604-5.
- [65] F. Shahidi, P. Ambigaipalan, Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review, *J. Funct. Foods*. (2015). doi:10.1016/j.jff.2015.06.018.
- [66] F. Martini, S.G. Rosa, I.P. Klamm, B.C.W. Fulco, F.B. Carvalho, F.L. Rahmeier, M.C. Fernandes, C.W. Nogueira, A multifunctional compound ebselen reverses memory impairment, apoptosis and oxidative stress in a mouse model of sporadic Alzheimer's disease, *J. Psychiatr. Res*. 109 (2019) 107–117. doi:10.1016/j.jpsychires.2018.11.021.

- [67] Q.-Q. Xu, Y.-J. Xu, C. Yang, Y. Tang, L. Li, H.-B. Cai, B.-N. Hou, H.-F. Chen, Q. Wang, X.-G. Shi, S.-J. Zhang, Sodium Tanshinone IIA Sulfonate Attenuates Scopolamine-Induced Cognitive Dysfunctions via Improving Cholinergic System, *Biomed Res. Int.* 2016 (2016) 1–9. doi:10.1155/2016/9852536.

## TABLES

**Table 1.** Primer sequences used for gene expression analysis.

Genes	Prim	
	Forward Sequence (5' - 3')	Reverse Sequence (5' - 3')
<i>β-actin</i>	CCGTAAAGACCTCTATGCCAAC	AGGAGCCAGAGCAGTAATCT
<i>AChE</i>	ACCTGTCCTCATCTGGATCT	GTTCCCACTCGGTAGTTCATAG
<i>ChAT</i>	GAGACCTCATCTGTGGAGTTG	GGCCTCTAGCTCTTTCCTTTG

**Table 2.** Effect of Blackcurrant (50 mg/kg) and/or Donepezil (5 mg/kg) on spontaneous locomotor activity in the control groups or Scopolamine-induced (SCO; 1 mg/kg) mice.

Group	Crossing (n)	Rearing (n)	Distance (m)	Speed ( m/s)
Control (saline)	134.60 ± 6.84	51.71 ± 2.99	7.282 ± 0.461	0.0243 ± 0.0015
Blackcurrant 50 mg/kg	135.50 ± 5.96	53.00 ± 3.91	7.377 ± 0.444	0.0230 ± 0.0013
Donepezil 5 mg/kg	153.90 ± 4.17	59.57 ± 5.55	7.358 ± 0.568	0.0244 ± 0.0019
Blackcurrant/Donepezil	142.00 ± 8.50	57.29 ± 6.56	6.659 ± 0.659	0.0222 ± 0.0022
SCO 1 mg/kg	138.00 ± 12.63	54.71 ± 5.57	5.979 ± 0.737	0.0227 ± 0.0034
Blackcurrant/SCO	147.40 ± 8.46	62.69 ± 7.26	6.482 ± 0.705	0.0247 ± 0.0029
Donepezil/SCO	122.00 ± 7.22	54.00 ± 4.57	5.622 ± 0.268	0.0190 ± 0.0009
Blackcurrant/Donepezil/SCO	142.10 ± 7.58	63.29 ± 5.18	6.791 ± 0.709	0.0228 ± 0.0023

Data were expressed as means ± S.E.M. The data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test when appropriate (n=8-11).

**Table 3.** Effect of Blackcurrant (50 mg/kg) and/or Donepezil (DNPZ; 5 mg/kg) on intracellular reactive species (RS) and non-protein thiols (NPSH) levels, and on the activity of enzymes glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GPx) in the cerebral cortex of control groups or Scopolamine-induced (SCO; 1 mg/kg) mice.

Group	RS	NPSH	GR	GST	GPx
Control (Saline)	260.3 ± 13.56	10.39 ± 0.09	16.93 ± 0.76	64.24 ± 2.95	6.924 ± 0.35
Blackcurrant 50 mg/kg	246.8 ± 17.78	10.48 ± 0.12	17.24 ± 0.64	52.17 ± 1.98	6.106 ± 0.72
DNPZ 5 mg/kg	185.6 ± 25.47	10.24 ± 0.14	18.10 ± 0.68	62.33 ± 2.85	5.396 ± 0.61
Blackcurrant/DNPZ	182.2 ± 4.62	10.36 ± 0.14	17.21 ± 0.53	67.52 ± 4.96	5.621 ± 0.36
SCO 1 mg/kg	403.8 ± 17.55****	9.50 ± 0.19**	13.72 ± 0.62*	44.96 ± 4.25*	4.519 ± 0.48*
Blackcurrant/SCO	299.9 ± 15.58##	10.13 ± 0.06#	18.70 ± 0.68####	79.07 ± 4.58####	5.206 ± 0.67
DNPZ/SCO	317.6 ± 19.18#	10.41 ± 0.14###	19.25 ± 0.67####	80.88 ± 2.01####	7.104 ± 0.49#
Blackcurrant/DNPZ/SCO	307.1 ± 17.37##	10.57 ± 0.16####	16.79 ± 0.52#	80.29 ± 4.04####	7.244 ± 0.75#

Data were expressed as means ± S.E.M. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 and \*\*\*\* P < 0.0001 indicates a significant difference from the control/saline group. # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 and #### P < 0.0001 indicates a significant difference from the Scopolamine/saline group (n=5-9).

**Table 4.** Effect of Blackcurrant (50 mg/kg) and/or Donepezil (DNPZ; 5 mg/kg) on intracellular reactive species (RS) and non-protein thiols (NPSH) levels, and on the activity of enzymes glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GPx) in the hippocampus of control groups or Scopolamine-induced (SCO; 1 mg/kg) mice.

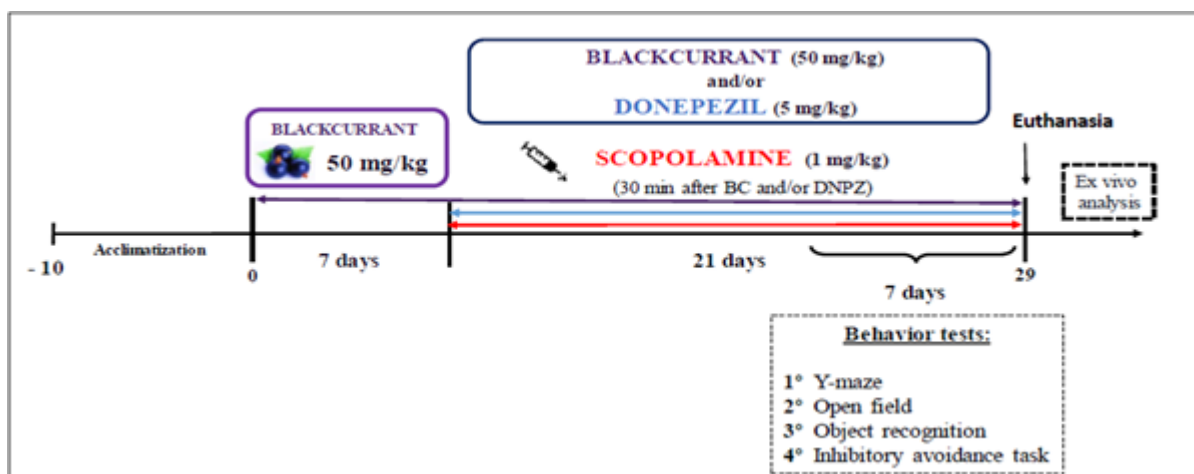
Group	RS	NPSH	GR	GST	GPx
Control (Saline)	401.0 ± 31.32	11.80 ± 0.28	15.58 ± 0.21	65.00 ± 1.86	6.38 ± 0.27
Blackcurrant 50 mg/kg	455.4 ± 23.33	12.03 ± 0.21	14.16 ± 0.38	63.68 ± 2.27	6.01 ± 0.42
DNPZ 5 mg/kg	331.6 ± 16.10	11.99 ± 0.28	14.43 ± 0.69	64.02 ± 3.41	6.53 ± 0.09
Blackcurrant/DNPZ	342.3 ± 50.49	11.57 ± 0.37	15.75 ± 0.37	62.90 ± 1.46	6.61 ± 0.13
SCO 1 mg/kg	550.3 ± 20.13 **	10.51 ± 0.42 *	13.07 ± 0.58 *	54.52 ± 1.91 *	4.55 ± 0.41 *
Blackcurrant/SCO	487.6 ± 21.64	11.99 ± 0.15 #	15.60 ± 0.66 #	68.16 ± 3.76 #	6.73 ± 0.37 ##
DNPZ/SCO	382.0 ± 30.68 ##	11.15 ± 0.19	15.61 ± 0.70 #	67.02 ± 2.68 #	6.18 ± 0.21 #
Blackcurrant/DNPZ/SCO	310.5 ± 28.51####	10.98 ± 0.32	15.61 ± 0.35 #	68.29 ± 3.53 #	6.04 ± 0.27 #

Data were expressed as means ± S.E.M. \* P < 0.05 and \*\* P < 0.01 indicates a significant difference from the control/saline group. # P < 0.05, ## P < 0.01 and #### P < 0.0001 indicates a significant difference from the Scopolamine/saline group (n=4-8).

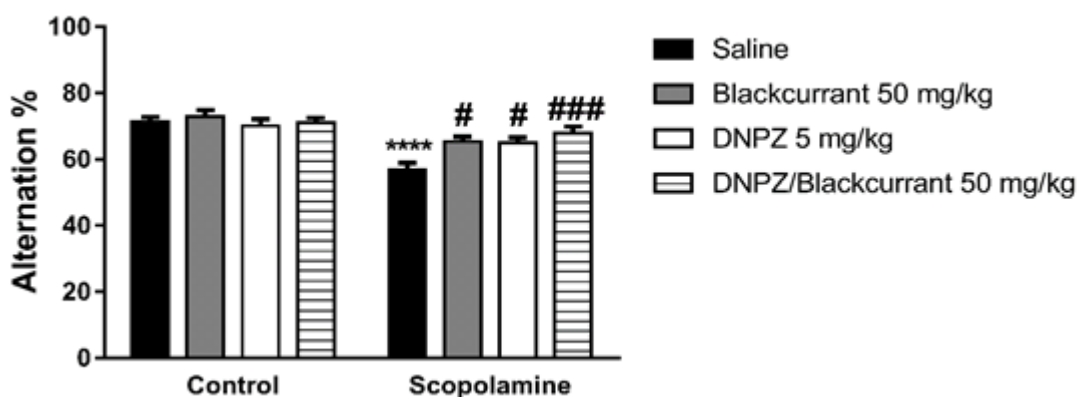
**Table 5.** F and P values of ANOVA of behavioral and biochemical parameters.

<b>Behavioral tests</b>	<b>F - value</b>	<b>P - value</b>
<i>Y- maze (Fig. 2)</i>		
Percentage of alternation	F (3,75) = 3.891	P=0.0122
<i>Open field (Table 2)</i>		
Crossings	F (3,74) = 2.503	P=0.0658
Rearing	F (3,48) = 0.7296	P=0.5279
Distance	F (3,74) = 0.835	P=0.4789
Speed	F (3,74) = 0.9148	P=0.4781
<i>Object Recognition (Fig. 3)</i>		
Training session (A)	F (3,74) = 0.3932	P=0.7582
Short-term memory (B)	F (3,74) = 4.383	P=0.0069
Long-term memory (C)	F (3,74) = 3.867	P=0.0126
<i>Inhibitory avoidance (Fig.4)</i>		
Training session (A)	F (3,32) = 0.6776	P=0.5722
Step-down latency (B)	F (3,32) = 0.6776	P=0.0170
<b>Biochemical parameters</b>		
<i>AChE activity (Fig. 5)</i>		
Cerebral cortex (A)	F (3,42) = 3.014	P=0.0405
Hippocampus (B)	F (3,40) = 2.914	P=0.0460
<i>BChE activity (Fig. 5)</i>		
Cerebral cortex (C)	F (1,39) = 25.08	P<0.0001
Hippocampus (D)	F (1,41) = 9.001	P=0.0046
<i>RS levels</i>		
Cerebral cortex (Table 3)	F (3,40) = 3.005	P=0.0415
Hippocampus (Table 4)	F (3,39) = 3.547	P=0.0231
<i>NPSH levels</i>		
Cerebral cortex (Table 3)	F (3,41) = 6.884	P=0.0007
Hippocampus (Table 4)	F (1,42) = 10.62	P=0.0022
<i>GR activity</i>		
Cerebral cortex (Table 3)	F (3,38) = 6.162	P=0.0016
Hippocampus (Table 4)	F (3,43) = 5.733	P=0.0022
<i>GST activity</i>		
Cerebral cortex (Table 3)	F (3,37) = 15.34	P<0.0001
Hippocampus (Table 4)	F (3,39) = 5.275	P=0.0038
<i>GPx activity</i>		
Cerebral cortex (Table 3)	F (3,43) = 6.253	P=0.0010
Hippocampus (Table 4)	F (3,41) = 5.38	P=0.0032
<i>AChE expression (Fig. 6)</i>		
Cerebral cortex (A)	F (1,16) = 66.67	P<0.0001
Hippocampus (B)	F (1,16) = 14.43	P=0.0016
<i>ChAT expression (Fig. 6)</i>		
Cerebral cortex (C)	F (3,16) = 0.5467	P=0.6574
Hippocampus (D)	F (3,16) = 3.373	P=0.0446
<i>AChE density (Fig. 7)</i>		
Cerebral cortex (A)	F (3,24) = 28.94	P<0.0001
Hippocampus (B)	F (1,22) = 11.18	P<0.0001

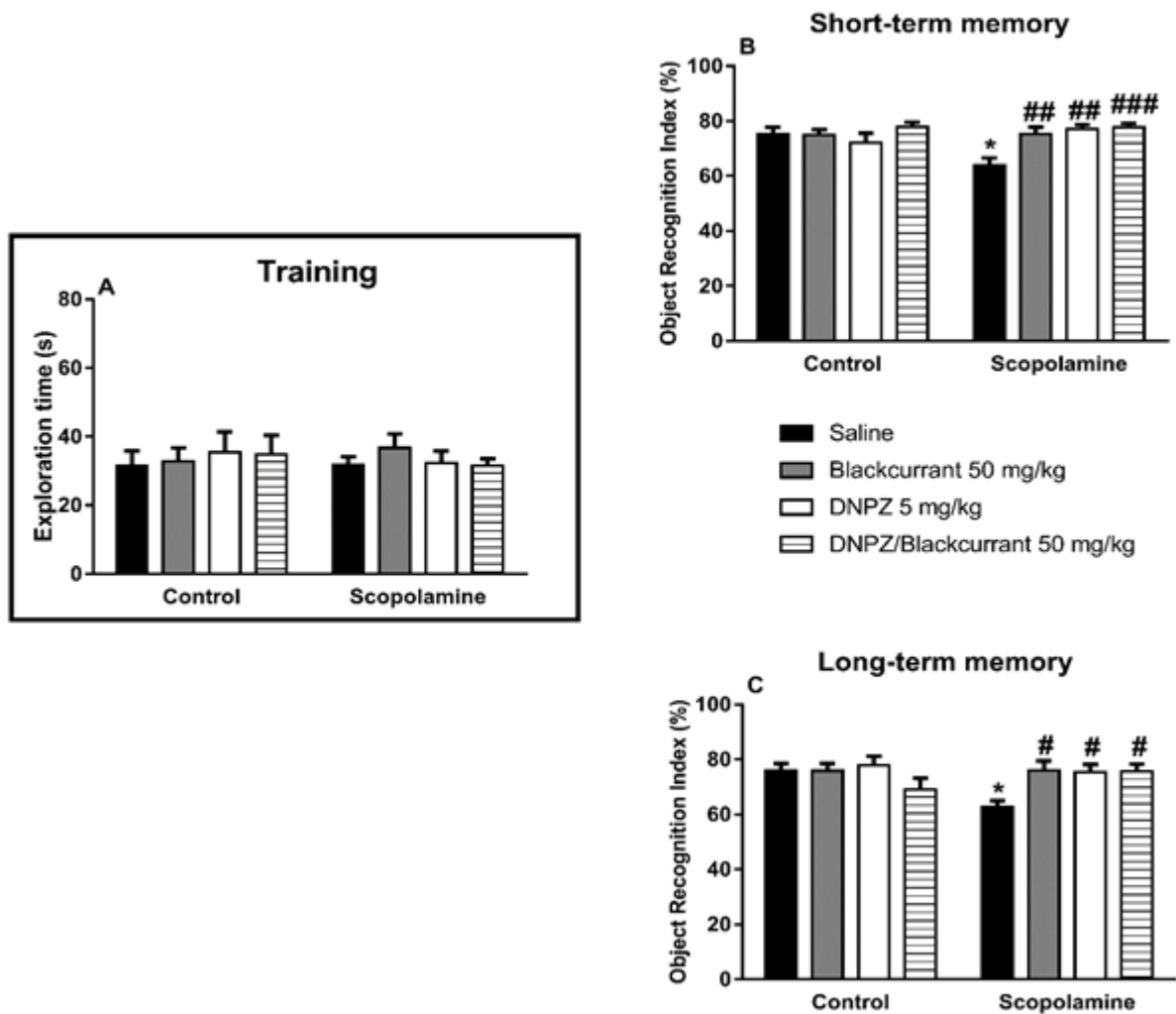
## FIGURES



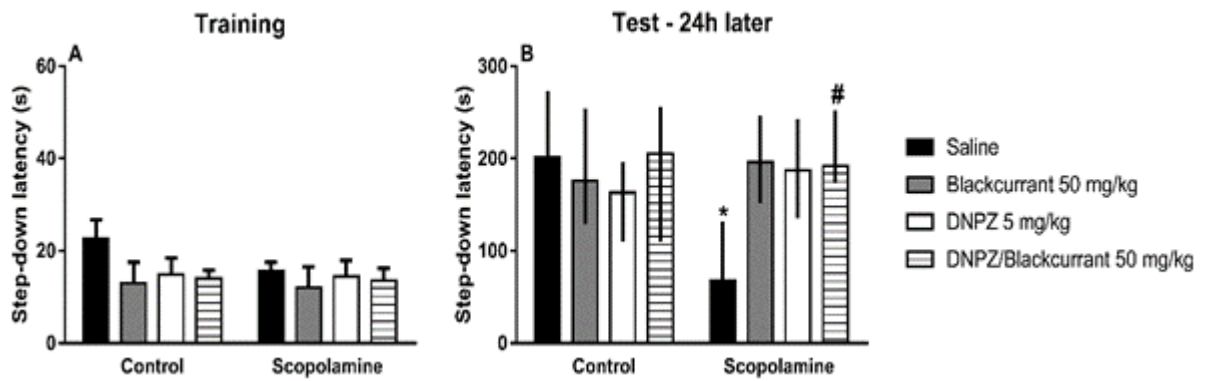
**Fig 1.** Experimental schedule.



**Fig 2.** Effect of Blackcurrant (50 mg/kg) and/or Donepezil (5 mg/kg) on spatial memory impairment induced by Scopolamine (1 mg/kg) in mice. The performance was assessed by alternation percentage in Y-Maze task. Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \*\*\*\*  $P < 0.0001$  indicates a significant difference from the control/saline group. #  $P < 0.05$  and ###  $P < 0.001$  indicates a significant difference from the Scopolamine/saline group. Bars represent mean  $\pm$  SEM (n=8-11).

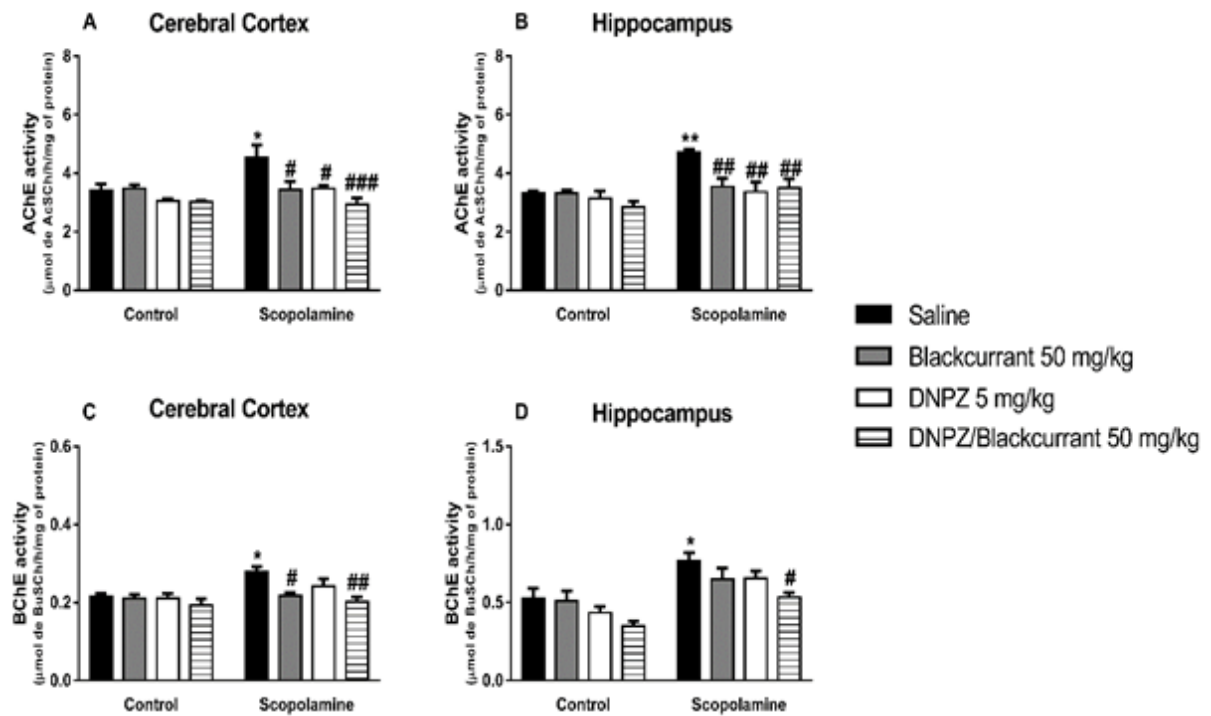


**Fig 3.** Effect of Blackcurrant (50 mg/kg) and/or Donepezil (5 mg/kg) on Scopolamine-induced spatial memory impairment in mice (1 mg/kg) after the object recognition test. (A) Training session, (B) Short-term memory (test assessed 4 h after training) and (C) Long-term memory (test assessed 24 h after training). Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \* $P < 0.05$  indicates a significant difference from the control/saline group. #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  and ###  $P < 0.001$  indicates a significant difference from the Scopolamine/saline group. Bars represent mean  $\pm$  SEM (n=8-11).

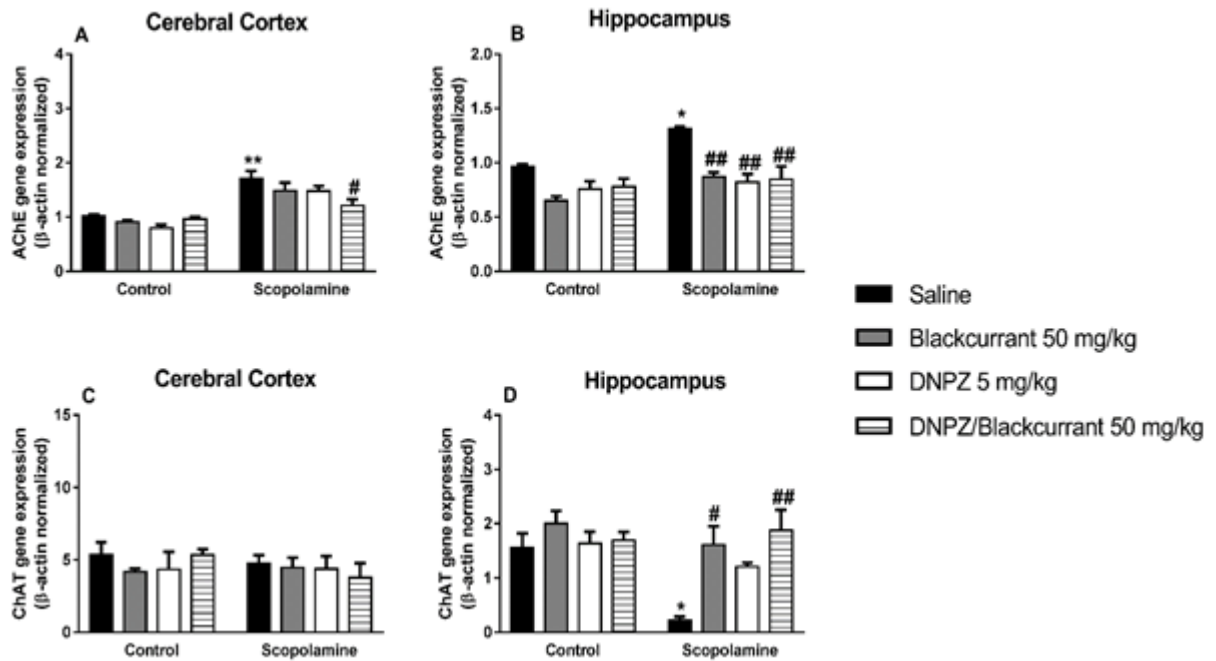


**Fig 4.** Effect of Blackcurrant (50 mg/kg) and Donepezil (5 mg/kg) treatment on aversive memory in the inhibitory avoidance test in Scopolamine-induced mice (1 mg/kg). (A) Step-down latency training and (B) Step-down latency test assessed 24 h after training. Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \*  $P < 0.05$  indicates a significant difference from the control/saline group. #  $P < 0.05$  indicates a significant difference from the Scopolamine/saline group. Bars represent (A) mean  $\pm$  SEM and (B) median  $\pm$  interquartile range of training and test measures (n=5).

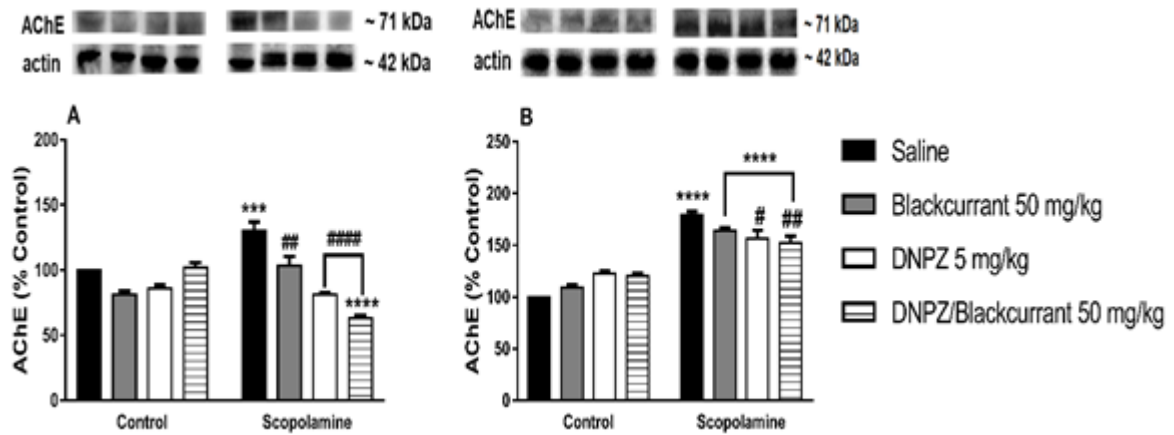




**Fig 5.** Effect of Blackcurrant (50 mg/kg) and/or Donepezil (5 mg/kg) on acetylcholinesterase (AChE) activity in cerebral cortex (A) and hippocampus (B), and butyrylcholinesterase (BChE) activity in cerebral cortex (C) and hippocampus (D) in Scopolamine-induced amnesia (1 mg/kg) in mice. Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$  indicates a significant difference from the control/saline group. #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  and ###  $P < 0.001$  indicates a significant difference from the Scopolamine/saline group. Bars represent mean  $\pm$  SEM (n=5-7).



**Fig 6.** Relative mRNA expression pattern of acetylcholinesterase (AChE) enzyme gene in cerebral cortex (A) and hippocampus (B), and choline acetyltransferase (ChAT) enzyme gene in cerebral cortex (C) and hippocampus (D) of mice treated with Blackcurrant (50 mg/kg) and/or Donepezil (5 mg/kg) in Scopolamine-induced amnesia (1 mg/kg) in mice. Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$  indicates a significant difference from the control/saline group. #  $P < 0.05$  and ##  $P < 0.01$  indicates a significant difference from the Scopolamine/saline group. Bars represent mean  $\pm$  SEM (n=3).



**Fig 7.** Representative and quantitative Western-blot analysis of the AChE density in cerebral cortex (A) and hippocampus (B) of mice treated with Blackcurrant (50 mg/kg) and/or Donepezil (5 mg/kg) in Scopolamine-induced. Equalization of protein loading was determined using actin as the house keeping protein. Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \*\*\*  $P < 0.001$  and \*\*\*\*  $P < 0.0001$  indicates a significant difference from the control/saline group. #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  and ####  $P < 0.0001$  indicates a significant difference from the Scopolamine/saline group. Bars represent mean  $\pm$  SEM (n=3-4).

## 4.2 MANUSCRITO II:

**Purinergic signaling changes and pro-inflammatory responses are prevented by  
Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) in a scopolamine-induced cognitive impairment model  
in mice**

Pauline da Costa<sup>1\*</sup>, Maria Rosa C. Schetinger<sup>1</sup>, Naiara Stefanello<sup>1</sup>, Charles E. Assmann<sup>1</sup>  
Jucimara Baldissarelli<sup>1</sup>, Karine P. Reichert<sup>1</sup>, Taís V. Palma<sup>1</sup>, Nathieli B. Bottari<sup>1</sup>, Thauan F.  
Lopes<sup>1</sup>, Letícia T. Druzian<sup>1</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>2</sup>, Vera M. Morsch<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Post-Graduation Program in Toxicological Biochemistry, Department of Biochemistry and  
Molecular Biology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, 97015-900,  
Brazil.

<sup>2</sup>Post-Graduation Program in Gerontology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa  
Maria, RS, 97015-900, Brazil.

\*Correspondent authors: Pauline da Costa and Vera Maria Morsch; <sup>a</sup>Post-Graduation Program  
in Toxicological Biochemistry, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal  
University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, 97015-900 Brazil.

*E-mail address:* line.dct@gmail.com (Pauline da Costa) and veramorsch@gmail.com (Vera  
Maria Morsch)

**Abstract**

Blackcurrant (BC; *Ribes nigrum* L.), an anthocyanin-rich berry, is known mainly for its antioxidant and neuroprotective activities. These properties may be associated with modulation of purinergic signaling, which aids for the normal functioning of the central nervous system. However, evidence for the effects of BC on purinergic signaling is lacking. Thus, we investigated the effects of BC and its association with Donepezil (DNPZ) on learning and memory, evaluated by the Morris Water Maze, and on the modulation of purinergic signaling, pro-inflammatory responses, and oxidative markers in a mouse model of cognitive impairment chronically induced by scopolamine (SCO). Animals were divided into twelve groups and treated with BC (50 or 100 mg/kg), and/or DNPZ (5 mg/kg), and/or SCO (1 mg/kg). Results showed that SCO decreased spatial learning and memory, as assessed by the Morris Water Maze test, and that treatment with BC and/or DNPZ prevented these effects. Moreover, BC and/or DNPZ treatments also prevented changes in NTPDase and ADA activities and restored the increased P2X7 and A2A receptors density in synaptosomes of the cerebral cortex of SCO-induced mice. Additionally, the increased NLRP3 inflammasome and cytokine (IL-1 $\beta$ ) expression levels, nitrites and nitrates, TBARS and protein carbonyl levels were reduced by BC and/or DNPZ treatments, compared to the SCO group. Overall, BC and/or DNPZ treatments improved cognitive decline induced by SCO, reduced oxidative stress and pro-inflammatory responses, and improved purinergic signaling. The findings suggest that BC could be a promising therapeutic agent for the prevention of memory deficits.

**Keywords:** Anthocyanins; Antioxidant; Neuroinflammation, Neuroprotection; Purinergic system; Scopolamine.

## 1. Introduction

Blackcurrant (BC; *Ribes nigrum* L.) is an important dark-pigmented berry widely consumed in the diet and commercialized as fruit juices, jellies, and liqueur [1, 2]. These fruits are a high-value natural raw material, as they contain fibers, minerals, and vitamins, including a high content of phenolic compounds such as anthocyanins [3]. Dietary supplementation of anthocyanins-rich berries has received particular interest due to the ability of these phenolic compounds to cross the blood-brain barrier and exert multiple beneficial properties, contributing to health promotion and disease prevention [2, 4].

Cyanidin and delphinidin have been shown to be the main anthocyanins in BC, and are known to have high antioxidant activities [5]. Previous studies revealed that these flavonoids reduce oxidative damage, due to scavenging reactive oxygen and nitrogen species, and are able to increase the activity of antioxidant enzymes in the brain of animals [1, 6]. In addition, there is evidence that anthocyanins provide neuroprotective activities, as they prevented cognitive impairment in a dementia model [2, 7].

The progressive loss of cognitive functions, especially of learning and memory, is one of the major manifestations of dementia, which affects millions of people worldwide. [8]. Cholinergic neurotransmission deficiencies are also associated with these deficits, hence cholinesterase inhibitors are used to potentiate the neuronal transmission and treat the symptoms of dementia related to Alzheimer's Disease (AD) [9, 10]. Donepezil is a standard second-generation drug that has been used in mild and moderate stages of AD; it has a longer half-life than other cholinesterase inhibitors', but long-term therapy has also been associated with adverse effects [11]. Moreover, experimental studies with animals have shown that scopolamine (SCO), a nonselective muscarinic receptor antagonist, causes learning and memory impairment, leading to amnesia, mimicking some of the effects observed in the early stages of neurodegenerative diseases [12, 13]. In addition, several studies have shown that

alterations in the purinergic system can also be associated with pathological conditions that induce amnesia, as the involvement of purinergic signaling in learning and memory processes is well described in the literature [14, 15]. It is known that adenine nucleotides and nucleosides are ubiquitous and versatile molecules which, once secreted into the extracellular medium, act as signaling molecules [16].

After the release, binding, and activation of their target receptors, adenine nucleotides and nucleosides are rapidly degraded by a complex of enzymes present on the surface of the cell membranes, such as ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase; CD39; E.C 3.6.1.5), ecto-5'-nucleotidase (5'-nucleotidase; CD73; E.C. 3.1.3.5), and adenosine deaminase (ADA; EC 3.5.4.4). Thus, these enzymes control and maintain the homeostasis of nucleotide-mediated signaling [17].

Adenosine triphosphate (ATP) is considered a non-classical neurotransmitter and is able to modulate synaptic transmission, binding to specific receptors from the P2 family [18]. The P2X7 receptor is one of the most important ionotropic receptor subtypes, expressed in the central nervous system (CNS) and activated by high levels of ATP. Additionally, studies have related that activation of the P2X7 receptor (P2X7R) by ATP may result in the release of pro-inflammatory molecules, such as the Nod-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), which are elevated in the brain of AD patients [19, 20]. Moreover, adenosine, a molecule derivative from the extracellular metabolism of ATP, acts in neuroprotection, neuromodulation, and synaptic plasticity, through its binding to P1 receptors. It has been shown that alterations in P2X7R and A2AR expression contribute to the development of neurodegenerative diseases [14, 21].

Considering that changes in purinergic signaling might trigger cognitive disorders, and the various beneficial effects of anthocyanins (mainly antioxidant and neuroprotective properties), this study aimed to investigate whether BC, and its association with Donepezil, is

able to prevent memory impairments induced by SCO, decrease oxidative stress and pro-inflammatory responses, and positively modulate purinergic signaling in mice.

## **2. Materials and methods**

### *2.1 Drugs and Chemicals*

Scopolamine, acetonitrile, malondialdehyde tetrabutylammonium salt (MDA); 2-thiobarbituric acid (TBA); Percoll, ATP, ADP, AMP, adenosine substrates, trizma base, sodium azide, malachite green, trichloroacetic acid (TCA), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), and Coomassie brilliant blue G were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Antibodies for anti-P2X7 and anti-A2A, and actin were obtained from Santa Cruz Biotech Inc. (Santa Cruz, CA). Donepezil hydrochloride was purchased from a local pharmacy (Santa Maria, Brazil). The BC extract (NutriPhy® Blackcurrant 100/40805/ Gin: 686831) was donated by Christian Hansen A/S. According to the appraisal supplied by this company, the BC extract contains, approximately, 30% cyanidin-3-glycoside and 35% delphinidin-3-rutinoside, which were determined by HPLC internal and UV-spectrophotometric methods, respectively.

### *2.2 Animals*

Adult male Swiss mice (n = 102; 60 days old; weighing  $36 \pm 1.0439$  g) were used in the experiments. Animals were kept in polypropylene cages, following standardized conditions of temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and humidity (70%), under a 12h light/dark cycle with free access to water and food. All experimental procedures were conducted in accordance with the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Scientific Research Activities (DBCA) and were approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (protocol



number 8343230616/2016), which is affiliated to the National Council for the Control of Animal Experimentations (CONCEA).

### *2.3 Experimental Protocol*

In this study, the animals received blackcurrant (BC; 50 or 100 mg/kg) [5, 22], Donepezil (DNPZ; 5 mg/kg) [23], and Scopolamine (SCO; 1 mg/kg) [12] once daily. All compounds were freshly prepared in saline before administration. BC and DNPZ were administered at a volume of 10 mL/kg by oral gavage and SCO at a volume of 5 mL/kg intraperitoneally (i.p.). The vehicle (saline) was administered by oral gavage and/or i.p. daily. Mice were randomly divided into twelve groups as follows: Group 1: control (saline); Group 2: BC 50; Group 3: BC 100; Group 4: DNPZ; Group 5: BC 50 + DNPZ; Group 6: BC 100 + DNPZ; Group 7: SCO; Group 8: BC 50 + SCO; Group 9: BC 100 + SCO; Group 10: DNPZ + SCO; Group 11: BC 50 + DNPZ + SCO; Group 12: BC 100 + DNPZ + SCO. In this experimental schedule (Fig. 1), animals received only BC in the first seven days. Subsequently, BC, DNPZ and SCO were administered for another 21 days; BC and DNPZ were administered at least 30 min before SCO administration. The Morris water maze test was performed in four consecutive sessions (days 25 to 28). During this behavior test, BC and DNPZ were administered at 60 min, and SCO was injected at 30 min before training sessions. Twenty-hours after the test, animals were anesthetized under isoflurane atmosphere and decapitated. The brain was removed and the cerebral cortex isolated, homogenized in adequate buffers, and used to perform biochemical studies.

### *2.4 Morris Water Maze Test (MWM)*

This behavioral test was carried out to evaluate spatial learning and memory, according to [24] with modifications. The apparatus comprised a black circular tank of 109 cm diameter

x 80 cm height, located in a room with several visual cues, and filled with 50 cm deep warm water ( $25 \pm 1$  °C), and an escape platform (10 cm diameter) submerged 2 cm below the water surface. In addition, a video camera was placed above the tank to record the experiment. The maze was divided into four equal imaginary quadrants and the escape platform was placed in the center of the northwest quadrant, which was maintained in all trial sessions. The MWM test consisted of three days of training (acquisition trials) and one testing session (retention trial) on the 4th day. The training sessions were started by placing the mice in the water facing the wall of the tank, at one of the four demarcated quadrants; the mice were then allowed to swim. The session was stopped when the animal found and climbed onto the platform within the maximum time of 60 seconds, and the escape time was recorded. If the mice failed to find the platform in the cut-off period, they were guided by the experimenter and remained there for 40s. Four trials were performed, and the starting position was varied each time. Twenty-four hours after the last training, the platform was removed and each mouse was placed in a similar starting position (opposite quadrant) and allowed to freely swim for 60s. After each trial session, the animals were dried and heated. The average time for each mouse to reach the escape platform in four trial sessions over three days, average swim speed (m/s), distance traveled (m), crossings of the target quadrant (n), time spent in the target quadrant (s), and time spent in the opposite quadrant (s) in the test day (probe trial) were determined using the video-tracking software ANY-maze™ (Stoelting CO, USA, version 6.1).

### *2.5 Synaptosomes Preparation*

Cerebral cortex synaptosomes were prepared as previously described [25]. The cortex was carefully homogenized in ice-cold medium (Medium I), containing 320 mM sucrose, 0.1 mM EDTA, and 5 mM HEPES, pH 7.5, and centrifuged at 800 g for 10 min. After, the synaptosomal fraction was separated through the discontinuous Percoll gradient (7%, 15%, and

23%). Thus, the synaptosomes formed between 15 and 23% of Percoll gradients were collected (3 mL), washed twice with medium I, and centrifuged at 15,000 g for 10 minutes to remove the Percoll contaminant. The pellet was resuspended in medium I and the final protein concentration was adjusted to 0.4-0.6 mg/mL. The synaptosomes were maintained at 0-4°C throughout the procedure and used for NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA assays.

### *2.6 NTPDase and 5'-Nucleotidase Enzymatic Assay*

The NTPDase and 5'-nucleotidase activities were determined in the cerebral cortex synaptosomes in 96-well plates according to [26] and [27] respectively, with some modifications by [28]. The reaction system contained 6 mM glucose, 5 mM KCl, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, and 20 µL of the sample at a final volume of 220 µL. The reaction system of 5'-nucleotidase consisted of 10mM MgCl<sub>2</sub> instead of CaCl<sub>2</sub>. After pre-incubation at 37°C for 10 min, the ATP or ADP (1 mM) or AMP (2 mM) substrates were added to start the reaction and incubated for another 30 min. Subsequently, the reactions were stopped by the addition of 150 µL of 15% trichloroacetic acid, and the colorimetric method with malachite green and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as standard was used to determine released inorganic phosphate (Pi). All samples were evaluated in triplicate and the enzyme activities were expressed as nmol Pi/min/mg of protein.

### *2.7 Adenosine Deaminase (ADA) Activity Assay*

ADA activity was estimated in cerebral cortex synaptosomes, according to a method described by [29], with modifications. This method consists of the direct quantification of a colored indophenol complex from ammonia, produced when ADA acts in excess of adenosine. The final protein concentration was adjusted to 0.6-0.8 mg/mL. A 50 µL aliquot of the sample was incubated with 21 mmol/L adenosine at pH 6.5 and 37°C for 60 min. The reaction was

stopped by adding a solution of 106/0.16 mM phenol-nitroprusside/mL and immediately mixed with 125/11 mM alkaline-hypochlorite. Ammonium sulfate (75 mM) was used as a standard. The enzyme activity was expressed in U/mg of protein.

### *2.8 Western Blotting*

The cerebral cortex was homogenized in ice-cold radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer) with 1 mM of proteases and phosphatases inhibitors. Protein concentration was determined using the BCA Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich, EUA). The diluted samples were separated by sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, UK) by electroblotting. After blocking using 5% BSA in 0.1% Tris-buffered saline with Tween-20 (TBS-T), the blots were incubated with the primary antibody anti-P2X7 receptor (dilution 1:200), and anti-A2A receptor (dilution 1:600) (Santa Cruz Biotechnology). The membrane was washed three times with TBS-T for 10 min, followed by incubation with a secondary antibody (dilution 1:10000) for 90 min. The membranes were incubated with enhanced chemifluorescent substrate (Amersham Biosciences) and then analyzed with an Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences, EUA). The membranes were re-probed and tested for actin immunoreactivity, as the control for the concentration of proteins, as previously described by [30].

### *2.9 Gene Expression Analysis*

Gene expression of the NLRP3 inflammasome and IL-1 $\beta$  cytokine in the cerebral cortex was analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), as previously described [31]. In brief, total RNA was extracted using TRIzol<sup>®</sup> reagent (Thermo Fisher Scientific, NY, USA) and quantified using spectrophotometer equipment at 260 nm. The samples were treated with 0.2  $\mu$ L of DNAase at 37°C for 5 min, followed by heating at 65°C

for 10 min. Reverse transcription was performed by using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The reaction consisted of the following steps: 25°C for 5 min, heating at 42°C for 30 min, and at 85°C for 5 min, and a final cooling at 5°C for 60 min. At last, qRT-PCR reaction was performed in a final volume of 20  $\mu$ L with 1  $\mu$ L of cDNA using 1X QuantiFast SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit in a Rotor-Gene Q PCR machine (Qiagen, Hilden, Germany). The  $\beta$ -actin (Actb) gene was used as the housekeeping control to normalize gene expression. Forward (F; 5'-3') and reverse (R; 5'-3') primer sequences were used as follows:  $\beta$ -actin (F) CCGTAAAGACCTCTATGCCAAC; (R) AGGAGCCAGAGCAGTAATCT. NLRP3 (F) CCCATACCTTCAGTCTTGTCTTC; (R) CTGCCACAAACCTTCCATCTA. IL-1 $\beta$  (F) GGTACATCAGCACCTCACAA; (R) TTAGAAACAGTCCAGCCCATAC.

## 2.10 Oxidative Stress Parameters

### 2.10.1 NO<sub>x</sub> assay (NO<sub>2</sub> plus NO<sub>3</sub>)

The NO<sub>x</sub> was determined in the cerebral cortex according to [32]. The samples were homogenized in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. After which, an aliquot was homogenized in 200 mM Zn<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and acetonitrile (96%) and centrifuged at 16,000 g at 4°C for 20 min. The cerebral supernatant was collected for analysis of NO<sub>x</sub> content. Nitrite and nitrate solutions were used as standards. The resulting pellet was suspended in NaOH (6 M). The NO<sub>x</sub> levels were quantified by absorbance at 570 nm and expressed as  $\mu$ mol/mg of protein.

### 2.10.2 Determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

TBARS levels in the cerebral cortex were determined according to [33]. Samples were homogenized in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, and centrifuged at 2,000 g for 10 min. The protein concentration was adjusted to 0.6-0.8 mg/mL. To an aliquot of supernatant or standard (0.03mM MDA), 8.1%SDS, 0.8% TBA, and 2.5 M acetic acid solution were added, and then

heated at 95°C for 120 min. The supernatant was used to measure the concentration of malondialdehyde (MDA) as a final product of lipid peroxidation by reaction with thiobarbituric acid (TBA). TBARS levels were measured at 532 nm and expressed as nmol TBARS/mg of protein.

### 2.10.3 Protein carbonyl contents assay

Protein carbonyl in the cerebral cortex was determined according to [34], with modifications. In brain supernatant, an equal volume of 10% TCA was added to precipitate protein and then centrifuged at 5,000 rpm for 5 min, discarding the supernatant. Then, 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) or 2 N HCl were added to this protein precipitate and incubated at room temperature for 30 min, while being mixed vigorously every 15 min. Protein was precipitated by addition of 10% TCA, followed by centrifugation for 5 min at 5,000 rpm. After discarding the supernatant, the precipitate was washed with ethyl acetate: ethanol (1:1) and centrifuged at 5,000 rpm for 5 min to remove the free DNPH. Pellets were dissolved in protein-dissolving buffer (2% SDS and 50 mg EDTA in 80 mM phosphate buffer, pH 8.0) and incubated at 37°C for 10 min. The color intensity of the supernatant was measured using a spectrophotometer at 370 nm and expressed as nmol/mg of protein.

### 2.11 Statistical Analysis

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism (version 7.00). Data normality was determined using a Shapiro-Wilk test. Two-way ANOVA tests followed by Tukey *post-hoc* tests for multiple comparisons were used to determine statistical significance. Values of F and P were shown in Table 3. Results were expressed as mean  $\pm$  standard errors of the mean (SEM). Values with  $P < 0.05$  were considered as statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1 Morris Water Maze

Table 1 shows the latencies to reach the escape platform of mice treated with BC (50 or 100 mg/kg) and/or DNPZ and induced by SCO, across three days of training in the MWM. SCO promoted a significant increase in escape latency in the second (42%,  $P < 0.05$ ) and third (58%,  $P < 0.05$ ) days in the SCO group, compared with control group. However, these effects were prevented by the ingestion of BC (50 or 100 mg/kg) with DNPZ on both training days, compared with the SCO group ( $P < 0.05$ ). There were no significant differences between groups for escape latency on the first-day training.

Fig. 2 illustrates the effect of treatment with BC (50 or 100 mg/kg) and/or DNPZ on crossings in the target quadrant, and on the time spent in the target and opposite quadrants of SCO-induced mice in the probe trial. Statistical analysis revealed that SCO significantly reduced the number of crossings in the target quadrant (52%,  $P < 0.001$ , Fig. 2A) in the SCO group, compared with the control group. When the time spent in the target and opposite quadrants were analyzed, we observed that SCO caused a significant decrease in time spent in the target quadrant (40%,  $P < 0.001$ , Fig. 2B) and an increase in time spent in opposite quadrants (57%,  $P < 0.05$ , Fig. 2C) in the SCO group compared with control group. However, all treatments with BC (50 or 100 mg/kg) and/or 5 mg/kg DNPZ prevented the changes in crossings in the target quadrant and times spent in both the target and opposite quadrants, compared with SCO group ( $P < 0.05$ ).

The results presented in Table 2 exhibit the effect of BC (50 or 100 mg/kg) and/or DNPZ treatments on spontaneous locomotor activity of SCO-induced mice. There were no significant differences in the total distance traveled and average swimming speed between groups during the probe trial ( $P > 0.05$ ).

### 3.2 NTPDase, 5'-Nucleotidase, and ADA activities

The effect of BC (50 or 100 mg/kg) and/or DNPZ on NTPDase, 5'-nucleotidase and ADA activities on cerebral cortex synaptosomes of SCO-induced mice are shown in Figure 3. The results revealed that SCO significantly decreased ATP (41%,  $P < 0.05$ , Fig. 3A) and ADP (55%,  $P < 0.01$ , Fig. 3B) hydrolysis, assessed by NTPDase activity, in the SCO group compared with the control group. In addition, ADA activity increased (64%,  $P < 0.01$ , Fig. 3D) in the SCO group, compared with the control group. The association of 100 mg/kg BC with DNPZ prevented the decrease in NTPDase activity using ATP as substrate, compared with the SCO group ( $P < 0.05$ ). Moreover, treatment with 100 mg/kg BC, 5 mg/kg DNPZ, and the association of BC (50 or 100 mg/kg) with DNPZ, restored the decreased NTPDase activity using ADP as substrate, compared with the SCO group ( $P < 0.05$ ). Furthermore, all treatments with BC (50 or 100 mg/kg) and/or DNPZ were able to restore the increase in ADA activity, compared with the SCO group ( $P < 0.05$ ). There were no significant differences in AMP hydrolysis assayed by 5'-nucleotidase activity between groups ( $P > 0.05$ ; Fig. 3C).

### 3.3 P2X7 and A2A receptors density analysis

Figure 4 exhibits the results of the treatment with BC (50 or 100 mg/kg) and/or DNPZ on the P2X7 and A2A receptors density in the cerebral cortex of SCO-induced mice. Western blot analysis showed that SCO caused a significant increase in P2X7 receptor density (Fig. 4A) in the SCO (53%,  $P < 0.001$ ), BC 50 + SCO (47%,  $P < 0.01$ ), BC 100 + SCO (39%,  $P < 0.01$ ) groups and A2A receptor density in the SCO group (26%,  $P < 0.05$ , Fig 4B) compared with control group. On the other hand, the treatment with DNPZ 5 mg/kg and the association of BC 100 mg/kg with DNPZ were able to prevent the increase in P2X7 density compared to the SCO group ( $P < 0.05$ ). In relation to A2A receptor density, the association of BC (50 or 100 mg/kg) with DNPZ prevented the increase in receptor density compared with the SCO group ( $P < 0.05$ ).



Moreover, the association of BC 100 mg/kg with DNPZ caused a significant decrease in A2A receptor density compared with the control group ( $P < 0.05$ ).

### *3.4 NLRP3 and IL-1 $\beta$ genes expression analysis*

In Figure 5, we observed the effect of treatment with BC (50 or 100 mg/kg) and/or DNPZ on NLRP3 and IL-1 $\beta$  gene expressions in the cerebral cortex of SCO-induced mice. The results demonstrated that the SCO significantly increased NLRP3 (93%;  $P < 0.0001$ ; Fig. 5A) and IL-1 $\beta$  (88%;  $P < 0.001$  Fig. 5B) gene expressions in the SCO groups, compared with control groups. However, the treatments with BC (50 or 100 mg/kg) and/or DNPZ prevented the increase in NLRP3 and IL-1 $\beta$  gene expressions, compared to the SCO group ( $P < 0.0001$ ).

### *3.5 Oxidative stress parameters analysis*

The results obtained for NO<sub>x</sub>, TBARS and protein carbonyl levels in the cerebral cortex of mice treated with BC (50 or 100 mg/kg) and/or DNPZ and induced by SCO are presented in Figure 6. Statistical analysis indicated that SCO significantly increased NO<sub>x</sub> (59%;  $P < 0.01$ ; Fig. 6A), TBARS (27%;  $P < 0.05$ ; Fig. 6B) and protein carbonyl (43%;  $P < 0.05$ ; Fig. 6C) levels in the SCO group, compared with the control group. However, BC (50 or 100 mg/kg) and/or DNPZ treatments were able to restore NO<sub>x</sub> and TBARS levels, compared with the SCO group ( $P < 0.05$ ). Also, the association of BC (50 or 100 mg/kg) with DNPZ prevented the increase in protein carbonyl levels in the SCO group, compared with the control group ( $P < 0.05$ ).

## **4. Discussion**

Previous evidence has shown that the ability of BC to preserve or improve neuronal function is largely attributed to its high anthocyanins content, in particular, cyanidin and delphinidin, which comprise 65% of the anthocyanins found in BC extract. Anthocyanins from

food and extracts are promising neuroprotectors, as they can delay aging progression and the development of neurodegenerative diseases [5, 35, 36]. Consistent with this, 50 mg/kg BC extract was administrated as a positive control to verify the efficacy of anthocyanins from Mulberry on learning and recognition deficits, assessed by an acute avoidance test in senescence-accelerated mice [5]. Similarly, the standard drug Donepezil indicated for AD patients, because of its inhibition of cholinesterases, has also been demonstrated to reverse age- or SCO-induced spatial memory deficits in many animals models [13, 37, 38].

Additionally, extracellular nucleotides and nucleosides are purinergic signaling molecules that interact with specific purinoreceptors, helping with the healthy functioning of the nervous system, and are involved in memory formation and regulation of inflammatory and pathological processes [14, 39]. Thus, to the best of our knowledge, this research is the first to produce evidence of the beneficial properties of BC, both alone and associated with DNPZ, on the modulation of purinergic signaling and pro-inflammatory responses, as well as in the oxidative damage in SCO-induced cognitive impairment model in mice.

In this experimental protocol, we applied the behavioral test of MWM, which is widely employed for the validation of spatial learning and memory disorders and even in the assessment of possible neurocognitive treatment [40]. Our results showed that BC (50 or 100 mg/kg) and/or DNPZ reduced the latency time, as well as ameliorating swimming patterns in the target quadrant, which indicated that they effectively improved deficits in the spatial memory acquisition and retention of SCO-induced mice. Furthermore, spontaneous locomotion activity of animals, represented by total distance traveled and average swimming speed, were similar between the groups, suggesting that no experimental procedure changed peripheral locomotion and the behavioral alterations were related to memory deficits [41–43]. These findings confirm the anti-amnesic effects of BC, alone and in combination with DNPZ. In line with this data, studies have revealed that anthocyanin supplementation improved behavioral

performance in old rats [44] and in D-Galactose-induced aging model rats in the MWM test [45]

In fact, the chronic administration of SCO promoted a successful model of amnesia, since it caused memory and learning deficits, exhibited through behavioral changes in the MWM test. It is well-known that these amnesic effects are associated with cholinergic dysfunction, a pathophysiological condition commonly found in neurodegenerative diseases [43, 46]. However, previous studies have also associated non-cholinergic alterations, such as disturbance in the purinergic signaling and oxidative damage, to the progression of these pathological conditions and to the deleterious effects of SCO [14, 47].

Purinergic signaling is involved in virtually all body functions, and ATP and adenosine are important neurotransmitters that modulate many processes related to learning and memory formation in the brain [14]. Moreover, ectonucleotidases anchored on the cell membrane control the extracellular levels of these nucleotides and nucleosides of adenine [39]. Therefore, the alterations in ATP and adenosine levels may lead to the decline of cognitive processes found in AD [14, 42, 48]. Our findings revealed that SCO injection inhibited NTPDase activity in synaptosomes of the cerebral cortex. Some authors have demonstrated that this reduction in ATP hydrolysis, induced by SCO, may lead to increased levels of extracellular ATP in the synaptic cleft, promoting purinergic signaling impairment by activation of apoptotic pathways, excitotoxicity, and neurodegeneration [47, 49]. Nevertheless, treatment with BC and/or DNPZ prevented the effects on ATP and ADP hydrolyzes, especially at the highest dose, since only the association of 100 mg/kg BC with DNPZ prevented the inhibition of NTPDase activity, using ATP as substrate. In addition, we observed that the association of BC (50 or 100 mg/kg) with DNPZ increased NTPDase activity, using ADP as substrate, but the treatment of 50 mg/kg BC alone was unable to increase this enzyme activity, unlike the 100 mg/kg BC dose. It has

been reported that anthocyanins restored changes in purinergic enzyme activities caused by acute intraperitoneal administration of SCO [42].

Several studies have revealed that the accumulation of extracellular ATP activates P2X7R. This receptor is directly coupled to nonselective cationic channels and, when activated by ATP binding, promotes the influx of Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> and efflux of K<sup>+</sup>, which leads to mitochondrial and plasma membrane depolarization and production of reactive species [18, 50]. In the immune cells of the CNS, the functional responses mediated by P2X7R are associated with the formation and activation of the inflammasome NLRP3, which plays a crucial role in the regulation of the innate immune response [20]. NLRs recognize to damage associated with them, such as environmental stress via oxidative injury. NLRP3, together with apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, forms the NALP3 inflammasome complex, which activates caspase-1, and caspase-1, in turn, processes proIL-1 $\beta$  into a mature form of IL-1 $\beta$  proinflammatory interleukin for secretion from cells [51, 52]. The P2X7R has also been shown to induce the release of other pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-18, and IL-6, as well as increase reactive species production and apoptotic cell death [19, 20]. Hence, upregulated P2X7R expression and release of proinflammatory cytokines in microglia of both patients and AD model mice has been observed [18, 19, 53].

Interestingly, we found an increase in P2X7R density and NLRP3 inflammasome and IL-1 $\beta$  expression in the cerebral cortex of SCO-induced mice, which evidenced that chronic administration of SCO stimulated neuroinflammation, a major component of AD [54]. However, treatment with 5 mg/kg DNPZ and the association of 100 mg/kg BC with DNPZ were able to attenuate the increase in P2X7R density; In addition, all treatments reduced NLRP3 and IL-1 $\beta$  expression, suggesting that these compounds exert anti-inflammatory effects; therefore, BC and DNPZ may be new and effective, approaches to neurodegenerative disease treatment.

Moreover, our results demonstrated that ADA activity increased in synaptosomes of the cerebral cortex of SCO-induced mice, presumably leading to the rapid hydrolysis of adenosine to inosine. Adenosine has been linked to neuromodulation, homeostatic regulation, and neuroprotection of the CNS, and its depletion could compromise adenosinergic neurotransmission, especially, memory formation [19, 26]. However, both treatments with BC and/or DNPZ were able to prevent an increase in ADA activity. In this context, Gutierrez et al. (2012) also observed that anthocyanins prevented the increase in ADA activity induced by acute administration of SCO, but these changes were only found in synaptosomes from the hippocampus. In addition, other authors have demonstrated that ADA inhibitors act as neuroprotective agents [55–57].

Adenosine's biological effects in the brain are mediated, mainly, through the activation of high-affinity receptors, such as A2AR. Some research has shown that these G-protein-coupled receptors may be altered in noxious brain conditions such as AD. Thus, these receptors have been investigated as potential therapeutic targets in cognitive disorders [58, 59]. In this study, we observed that the association of both BC doses with DNPZ abolished the increase in A2AR density in the cerebral cortex induced by SCO, with 100 mg/kg BC associated with DNPZ being the most efficient.

Therefore, our results seem to indicate there is an antagonistic effect produced by the association of BC with DNPZ, which could contribute to the improvement in memory deficit. Previous research has described the beneficial effects of A2A antagonism in the synaptic mechanisms of learning and memory in AD models [55, 59, 60], while the overexpression of A2A receptors indicates memory deficits, which corroborates with our findings [61]. Some evidence also suggested that this neuroprotection could be associated with A2AR's ability to control neuroinflammation, prevent the recruitment of activated microglia, and ameliorate neuronal dysfunction [56, 58, 62]. In line with these findings, we already related that both

treatments of BC and/or DNPZ inhibited pro-inflammatory molecules in the cerebral cortex. Thus, the simultaneous increase in the extracellular levels of adenosine by ADA inhibition, together with antagonism of A2ARs, may be an efficient neuroprotective strategy to prevent brain damage in adult animals SCO-induced [56].

It is known that oxidative stress has an important role in the deterioration of learning and memory in neurodegenerative diseases [63, 64]. In our investigation, SCO administration promoted an increase in NO<sub>x</sub>, TBARS, and protein carbonyl levels in the cerebral cortex. These augmented oxidative-nitrosative stress parameters, demonstrated by an overproduction of reactive nitrogen species (RNS), and leading to protein and lipid oxidation, which is consistent with previous studies of SCO-induced amnesia models [12, 47, 65]. Evidence has also correlated the increase of oxidative stress with the damage on the purinergic enzymes. The NTPDase enzymes are anchored in the plasma membrane and their activity can be lost in membrane injury induced by reactive species [47, 48].

Our findings show that BC and/or DNPZ treatments were able to prevent SCO pro-oxidant effects. Both treatment with BC and/or DNPZ reduced NO<sub>x</sub> and TBARS levels, and the association of both BC doses with DNPZ decreased protein carbonyl levels in the brain. These effects, provided by the treatment with BC, are similar to a previous report that showed that dietary supplementation with anthocyanin-rich berries reduced protein carbonyl formation and lipid oxidation in the brain, protected this tissue against chronic brain injury [5, 7, 66]. In addition, many studies also indicated that DNPZ improves oxidative damage in the brain of several AD animal models [23, 67, 68]. Therefore, we suggest that, besides its predominant role in AChE inhibition, antioxidant activity may contribute to the beneficial effects of DNPZ against dementia [37, 68]. This study shows that the protective effects, especially, in the biochemical parameters were more effective when both compounds were combined and at the highest dose of BC.

## Conclusion

In summary, our results emphasize the neuroprotective and neuromodulatory properties of BC, particularly when associated with DNPZ. Their systemic antioxidant properties prevented damage in the activity of membrane-bound enzymes and improving purinergic signaling, decreased pro-inflammatory responses induced by SCO, which restored learning and memory. Hence, BC may be a promising therapeutic agent in the prevention of cognitive deficits.

## Acknowledgments

This research was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROEX - process number: 23038.004173/2019-93, finance code 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- grant number: 306238/2017-9), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS/PRONEX - grant number: 16/2551-0000499-4). We are grateful to UFSM for providing research facilities and Christian Hansen LTDA for supplying the BC extract.

**Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

1. Jia N, Xiong YL, Kong B, et al (2012) Radical scavenging activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract and its inhibitory effect on gastric cancer cell proliferation via induction of apoptosis. *J Funct Foods* 4:382–390. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.01.009>
2. Karjalainen R, Anttonen M, Saviranta N, et al (2009) A review on bioactive compounds in black currants (*Ribes nigrum* L.) and their potential health-promoting properties. *Acta Hort* 301–307. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.839.38>
3. Gopalan A, Reuben SC, Ahmed S, et al (2012) The health benefits of blackcurrants. *Food Funct* 3:795–809. <https://doi.org/10.1039/c2fo30058c>

4. Youdim KA, Shukitt-Hale B, Joseph JA (2004) Flavonoids and the brain: interactions at the blood–brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Radic Biol Med* 37:1683–1693. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.002>
5. Shih PH, Chan YC, Liao JW, et al (2010) 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* 21:598–605. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.03.008>
6. Shahidi F, Ambigaipalan P (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *J. Funct. Foods*
7. Pacheco SM, Soares MSP, Gutierrez JM, et al (2018) Anthocyanins as a potential pharmacological agent to manage memory deficit, oxidative stress and alterations in ion pump activity induced by experimental sporadic dementia of Alzheimer's type. *J Nutr Biochem* 56:193–204. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.02.014>
8. Silva T, Reis J, Teixeira J, Borges F (2014) Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: from natural products to drug prototypes. *Ageing Res Rev* 15:116–145. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.03.008>
9. Guo C, Shen J, Meng Z, et al (2016) Neuroprotective effects of polygalacic acid on scopolamine-induced memory deficits in mice. *Phytomedicine* 23:149–155. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.12.009>
10. Pepeu G, Giovannini MG (2010) Cholinesterase inhibitors and memory. *Chem Biol Interact* 187:403–408. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.11.018>
11. Jackson S, Ham RJ, Wilkinson D (2004) The safety and tolerability of donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Br J Clin Pharmacol* 58:1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2004.01848.x>
12. Park HR, Lee H, Park H, et al (2016) Fermented Sipjeondaabo-tang Alleviates Memory Deficits and Loss of Hippocampal Neurogenesis in Scopolamine-induced Amnesia in Mice. *Sci Rep* 6:22405. <https://doi.org/10.1038/srep22405>
13. Li J, Gao L, Sun K, et al (2016) Benzoate fraction from *Gentiana rigescens* Franch alleviates scopolamine-induced impaired memory in mice model in vivo. *J Ethnopharmacol* 193:107–116. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.08.001>
14. Bagatini MD, dos Santos AA, Cardoso AM, et al (2018) The Impact of Purinergic System Enzymes on Noncommunicable, Neurological, and Degenerative Diseases. *J Immunol Res* 2018:1–21. <https://doi.org/10.1155/2018/4892473>
15. Bonan CD, Roesler R, Pereira GS, et al (2000) Learning-specific decrease in synaptosomal ATP diphosphohydrolase activity from hippocampus and entorhinal cortex of adult rats. *Brain Res* 854:253–256. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02300-8)
16. Di Virgilio F, Adinolfi E (2017) Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene* 36:293–303. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.206>



17. Fürstenau CR, Trentin DDS, Barreto-Chaves MLM, Sarkis JJF (2006) Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: Kinetic characterization and biochemical properties. *Platelets* 17:84–91. <https://doi.org/10.1080/09537100500246641>
18. Burnstock G (2006) Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* 27:166–176. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.01.005>
19. McLarnon JG, Ryu JK, Walker DG, Choi HB (2006) Upregulated expression of purinergic P2X7 receptor in Alzheimer disease and amyloid- $\beta$  peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus. *J Neuropathol Exp Neurol*. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000240470.97295.d3>
20. Erb L, Woods LT, Khalafalla MG, Weisman GA (2019) Purinergic signaling in Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 151:25–37. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.10.014>
21. Woods LT, Ajit D, Camden JM, et al (2016) Purinergic receptors as potential therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 104:169–179. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.031>
22. Carvalho FB, Gutierrez JM, Bueno A, et al (2016) Anthocyanins control neuroinflammation and consequent memory dysfunction in mice exposed to lipopolysaccharide. *Mol Neurobiol*. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9900-8>
23. Hong SM, Soe KH, Lee TH, et al (2018) Cognitive Improving Effects by Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Vinegar on Scopolamine-Induced Amnesia Mice Model. *J Agric Food Chem* 66:99–107. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03965>
24. Morris RGM (1981) Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv*. [https://doi.org/10.1016/0023-9690\(81\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0023-9690(81)90020-5)
25. Nagy A, Delgado-Escueta A V (1984) Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isoosmotic gradient material (Percoll). *J Neurochem* 43:1114–1123
26. Schetinger MR, Porto NM, Moretto MB, et al (2000) New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPDase activities. *Neurochem Res* 25:949–955
27. Heymann D, Reddington M, Kreutzberg GW (1984) Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. *J Neurochem* 43:971–978
28. Baldissarelli J, Santi A, Schmatz R, et al (2018) Hypothyroidism and hyperthyroidism change ectoenzyme activity in rat platelets. *J Cell Biochem* 119:. <https://doi.org/10.1002/jcb.26856>
29. Guist G, Galanti B (1984) Colorimetric method. HU Bergmeyer, *Methods Enzym Anal* 315–323

30. Rebola N, Pinheiro PC, Oliveira CR, et al (2003) Subcellular localization of adenosine A(1) receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus. *Brain Res* 987:49–58
31. Assmann CE, Cadoná CF, Bonadiman B da SR, et al (2018) Tea tree oil presents in vitro antitumor activity on breast cancer cells without cytotoxic effects on fibroblasts and on peripheral blood mononuclear cells. *Biomed Pharmacother* 103:1253–1261
32. Miranda KM, Espey MG, Wink DA (2001) A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5:62–71. <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0319>
33. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358
34. Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzym* 186:464–478
35. Medina dos Santos N, Berilli Batista P, Batista ÂG, Maróstica Júnior MR (2019) Current evidence on cognitive improvement and neuroprotection promoted by anthocyanins. *Curr Opin Food Sci* 26:71–78. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.03.008>
36. Smeriglio A, Barreca D, Bellocco E, Trombetta D (2016) Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. *Phyther. Res.*
37. Lindner MD, Hogan JB, Hodges DB, et al (2006) Donepezil primarily attenuates scopolamine-induced deficits in psychomotor function, with moderate effects on simple conditioning and attention, and small effects on working memory and spatial mapping. *Psychopharmacology (Berl)* 188:629–640. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0556-3>
38. Barai P, Raval N, Acharya S, Acharya N (2018) Neuroprotective effects of *Bergenia ciliata* on NMDA induced injury in SH-SY5Y cells and attenuation of cognitive deficits in scopolamine induced amnesia in rats. *Biomed Pharmacother* 108:374–390. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.011>
39. Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci* 32:19–29. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.10.001>
40. D’Hooge R, De Deyn PP (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 36:60–90
41. Gacar N, Mutlu O, Utkan T, et al (2011) Beneficial effects of resveratrol on scopolamine but not mecamlamine induced memory impairment in the passive avoidance and Morris water maze tests in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.05.017>
42. Gutierrez JM, Carvalho FB, Schetinger MR, et al (2012) Protective effects of anthocyanins on the ectonucleotidase activity in the impairment of memory induced by scopolamine in adult rats. *Life Sci* 91:1221–1228. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.09.013>

43. Aksoz E, Gocmez SS, Sahin TD, et al (2019) The protective effect of metformin in scopolamine-induced learning and memory impairment in rats. *Pharmacol Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2019.04.015>
44. Andres-Lacueva C, Shukitt-Hale B, Galli RL, et al (2005) Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutr Neurosci* 8:111–120. <https://doi.org/10.1080/10284150500078117>
45. Rehman SU, Shah SA, Ali T, et al (2017) Anthocyanins Reversed D-Galactose-Induced Oxidative Stress and Neuroinflammation Mediated Cognitive Impairment in Adult Rats. *Mol Neurobiol* 54:255–271. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9604-5>
46. Martini F, Pesarico AP, Brüning CA, et al (2018) Ebselen inhibits the activity of acetylcholinesterase globular isoform G4 in vitro and attenuates scopolamine-induced amnesia in mice. *J Cell Biochem* 119:5598–5608. <https://doi.org/10.1002/jcb.26731>
47. Marisco PC, Carvalho FB, Rosa MM, et al (2013) Piracetam Prevents Scopolamine-Induced Memory Impairment and Decrease of NTPDase, 5'-Nucleotidase and Adenosine Deaminase Activities. *Neurochem Res* 38:1704–1714. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1072-6>
48. de Oliveira JS, Abdalla FH, Dornelles GL, et al (2019) Neuroprotective effects of berberine on recognition memory impairment, oxidative stress, and damage to the purinergic system in rats submitted to intracerebroventricular injection of streptozotocin. *Psychopharmacology (Berl)* 236:641–655. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5090-6>
49. Ademiluyi AO, Ogunsuyi OB, Oboh G (2016) Alkaloid extracts from Jimson weed (*Datura stramonium* L.) modulate purinergic enzymes in rat brain. *Neurotoxicology* 56:107–117. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.06.012>
50. Skaper SD, Debetto P, Giusti P (2010) The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB J*. <https://doi.org/10.1096/fj.09-138883>
51. Broz P, Dixit VM (2016) Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol* 16:407–420. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.58>
52. Kersse K, Bertrand MJM, Lamkanfi M, Vandenabeele P (2011) NOD-like receptors and the innate immune system: Coping with danger, damage and death. *Cytokine Growth Factor Rev* 22:257–276. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.09.003>
53. Martin E, Amar M, Dalle C, et al (2019) New role of P2X7 receptor in an Alzheimer's disease mouse model. *Mol Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0108-3>
54. Ghumatkar PJ, Patil SP, Jain PD, et al (2015) Nootropic, neuroprotective and neurotrophic effects of phloretin in scopolamine induced amnesia in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 135:182–191. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.06.005>
55. Bortolotto JW, de Melo GM, Cognato G de P, et al (2015) Modulation of adenosine signaling prevents scopolamine-induced cognitive impairment in zebrafish. *Neurobiol Learn Mem*. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.11.016>

56. Cunha RA (2005) Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A receptor blockade. *Purinergic Signal* 1:111–134. <https://doi.org/10.1007/s11302-005-0649-1>
57. Maciel RM, Carvalho FB, Olabiyi AA, et al (2016) Neuroprotective effects of quercetin on memory and anxiogenic-like behavior in diabetic rats: Role of ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities. *Biomed Pharmacother.* <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.069>
58. Rodrigues RJ, Canas PM, Lopes L V., et al (2008) Modification of adenosine modulation of acetylcholine release in the hippocampus of aged rats. *Neurobiol Aging* 29:1597–1601. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.03.025>
59. Pagnussat N, Almeida AS, Marques DM, et al (2015) Adenosine A2A receptors are necessary and sufficient to trigger memory impairment in adult mice. *Br J Pharmacol* 172:3831–3845. <https://doi.org/10.1111/bph.13180>
60. Takahashi RN, Pamplona FA, Prediger RDS (2008) Adenosine receptor antagonists for cognitive dysfunction: a review of animal studies. *Front Biosci* 13:2614–32
61. Giménez-Llort L, Schiffmann SN, Shmidt T, et al (2007) Working memory deficits in transgenic rats overexpressing human adenosine A2A receptors in the brain. *Neurobiol Learn Mem* 87:42–56. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.05.004>
62. Rebola N, Simões AP, Canas PM, et al (2011) Adenosine A2A receptors control neuroinflammation and consequent hippocampal neuronal dysfunction. *J Neurochem* 117:100–111. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07178.x>
63. Nunomura A, Perry G, Aliev G, et al (2001) Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:759–67. <https://doi.org/10.1093/jnen/60.8.759>
64. Perry G, Moreira P, Santos M, et al (2008) Alzheimer Disease and the Role of Free Radicals in the Pathogenesis of the Disease. *CNS Neurol Disord - Drug Targets* 7:3–10. <https://doi.org/10.2174/187152708783885156>
65. Lee JS, Kim HG, Han JM, et al (2014) Ethanol extract of *Astragali Radix* and *Salviae Miltiorrhizae Radix*, Myelophil, exerts anti-amnesic effect in a mouse model of scopolamine-induced memory deficits. *J Ethnopharmacol* 153:782–792. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.03.048>
66. Rahman MM, Ichiyanagi T, Komiyama T, et al (2008) Effects of anthocyanins on psychological stress-induced oxidative stress and neurotransmitter status. *J Agric Food Chem.* <https://doi.org/10.1021/jf800930s>
67. He XL, Zhou WQ, Bi MG, Du GH (2010) Neuroprotective effects of icariin on memory impairment and neurochemical deficits in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice. *Brain Res.* <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.084>

68. Saxena G, Singh SP, Agrawal R, Nath C (2008) Effect of donepezil and tacrine on oxidative stress in intracerebral streptozotocin-induced model of dementia in mice. *Eur J Pharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.12.009>

## TABLES

**Table 1.** Effect of Blackcurrant (BC 50 and 100 mg/kg) and/or Donepezil (DNPZ 5 mg/kg) treatments to Scopolamine-induced (SCO 1 mg/kg) mice on the latencies to reach the escape platform (expressed in seconds) over 3 days training session in the Morris Water Maze test.

Groups	Day 1	Day 2	Day 3
Control	39.61 ± 1.94	30.53 ± 1.75	23.17 ± 1.50
BC 50	39.40 ± 3.40	28.43 ± 1.08	26.07 ± 2.42
BC 100	34.43 ± 1.79	29.34 ± 3.65	24.94 ± 3.09
DNPZ	34.63 ± 2.50	33.65 ± 3.36	25.55 ± 0.70
BC 50 + DNPZ	34.45 ± 4.58	28.23 ± 3.76	25.97 ± 2.34
BC 100 + DNPZ	32.95 ± 4.93	30.95 ± 3.36	27.65 ± 1.76
SCO	51.23 ± 3.04	45.13 ± 2.69 *	36.60 ± 2.43 *
BC 50 + SCO	43.73 ± 3.08	40.10 ± 3.80	27.21 ± 2.71
BC 100 + SCO	45.51 ± 2.40	34.52 ± 2.95	25.42 ± 2.65
DNPZ + SCO	43.59 ± 2.17	36.34 ± 2.47	26.24 ± 3.51
BC 50 + DNPZ + SCO	41.20 ± 3.09	32.75 ± 2.85 #	24.22 ± 2.21 #
BC 100 + DNPZ + SCO	40.00 ± 2.09	31.27 ± 3.35 #	24.12 ± 2.17 #

Values are reported as means ± S.E.M. for 6–10 mice per group. Two-way ANOVA followed by Tukey's test. \* P < 0.05 indicates a significant difference from the control group. # P < 0.05 indicates a significant difference from the SCO group.

**Table 2.** Evaluation of Blackcurrant (BC 50 and 100 mg/kg) and/or Donepezil (DNPZ 5 mg/kg) treatment on spontaneous locomotor activity of Scopolamine-induced (SCO 1 mg/kg) mice using the Morris Water Maze test.

Groups	Total distance traveled (m)	Average swimming speed (m/s)
Control	13.03 ± 0.74	0.197 ± 0.013
BC 50	12.17 ± 0.79	0.182 ± 0.014
BC 100	12.26 ± 0.69	0.187 ± 0.012
DNPZ	12.52 ± 0.76	0.205 ± 0.008
BC 50 + DNPZ	12.28 ± 0.45	0.196 ± 0.006
BC 100 + DNPZ	11.65 ± 1.18	0.175 ± 0.017
SCO	12.65 ± 0.87	0.207 ± 0.015
BC 50 + SCO	12.33 ± 1.02	0.178 ± 0.013
BC 100 + SCO	11.28 ± 1.10	0.167 ± 0.005
DNPZ + SCO	12.00 ± 0.75	0.194 ± 0.013
BC 50 + DNPZ + SCO	11.88 ± 0.69	0.179 ± 0.012
BC 100 + DNPZ + SCO	11.29 ± 0.74	0.175 ± 0.013

Values are reported as means ± S.E.M. for 6–10 mice per group. Two-way ANOVA followed by Tukey's test.

**Table 3.** F and P values of ANOVA of behavioral and biochemical parameters.

<b>Behavioral tests</b>	<b>F-value</b>	<b>P - value</b>
<i>Morris Water Maze</i>		
Training session - Spontaneous locomotor activity (Table 2)		
Total distance traveled (m)	F (5,96) = 0.0918	P=0.9933
Average swimming speed (m/s)	F (5,96) = 0.1779	P=0.9703
Test session - (Fig. 2)		
Number of crossings over the target quadrant (A)	F (5,96) = 2.445	P=0.0394
Time spent in the target quadrant (B)	F (5,96) = 5.054	P=0.0004
Time spent in the opposite quadrant (C)	F (5,90) = 2.815	P=0.0208
<b>Biochemical parameters</b>		
<i>Enzymes activities (Fig. 3)</i>		
<i>NTPDA</i>		
ATP (A)	F (5,51) = 2.931	P=0.0212
ADP (B)	F (5,50) = 6.754	P<0.0001
5'-nucleotidase (C)	F (5,50) = 0.109	P=0.9898
ADA (D)	F (5,50) = 6.426	P=0.0001
<i>Receptors densities</i>		
P2X7 (A)	F (5,24) = 4.599	P=0.0044
A2A (B)	F (5,24) = 8.365	P=0.0001
<i>Gene expression</i>		
NLRP3 inflammasome (A)	F (5,24) = 25.32	P<0.0001
IL-1 $\beta$ (B)	F (5,24) = 10.07	P<0.0001
<i>Oxidative Stress Parameters</i>		
NOx levels (A)	F (5,55) = 5.82	P=0.0002
TBARS levels (B)	F (5,49) = 5.82	P=0.0031
Protein carbonyl (C)	F (5,57) = 2.531	P=0.0388



## FIGURES

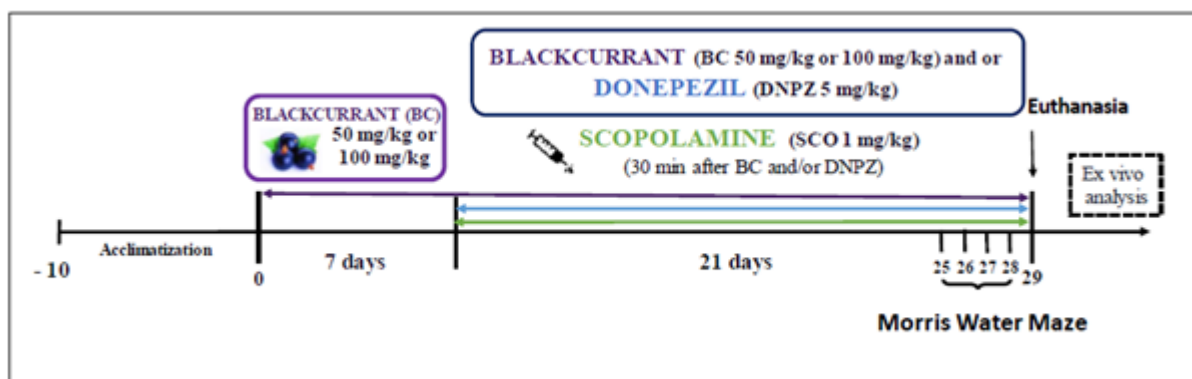
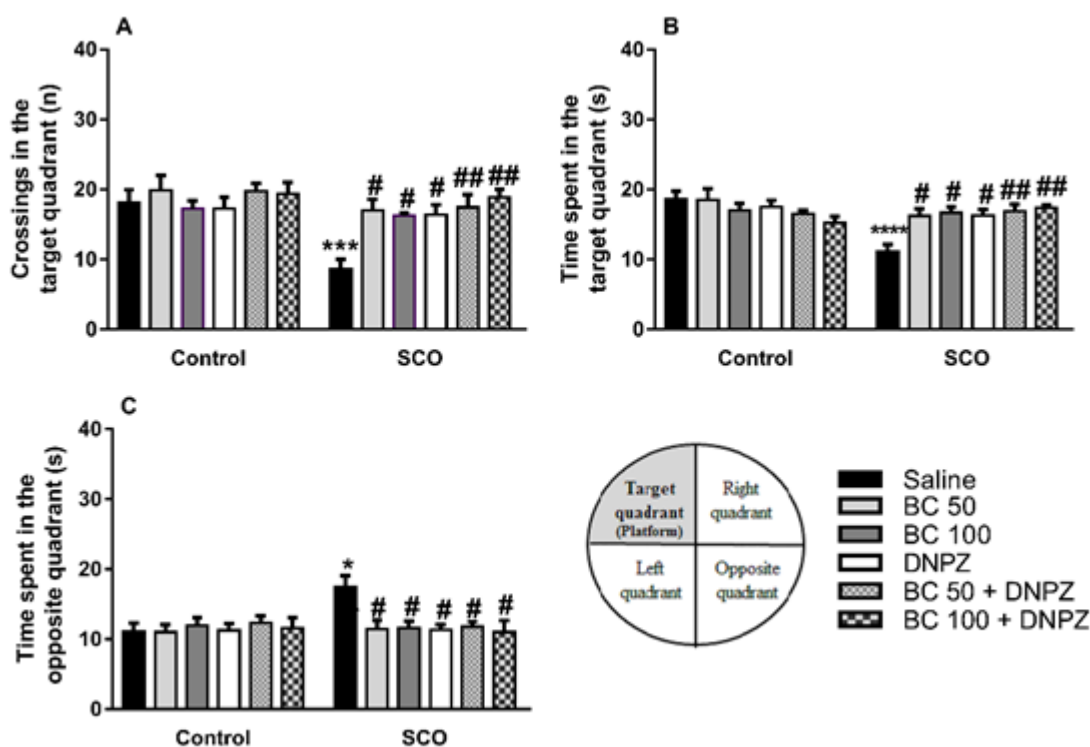
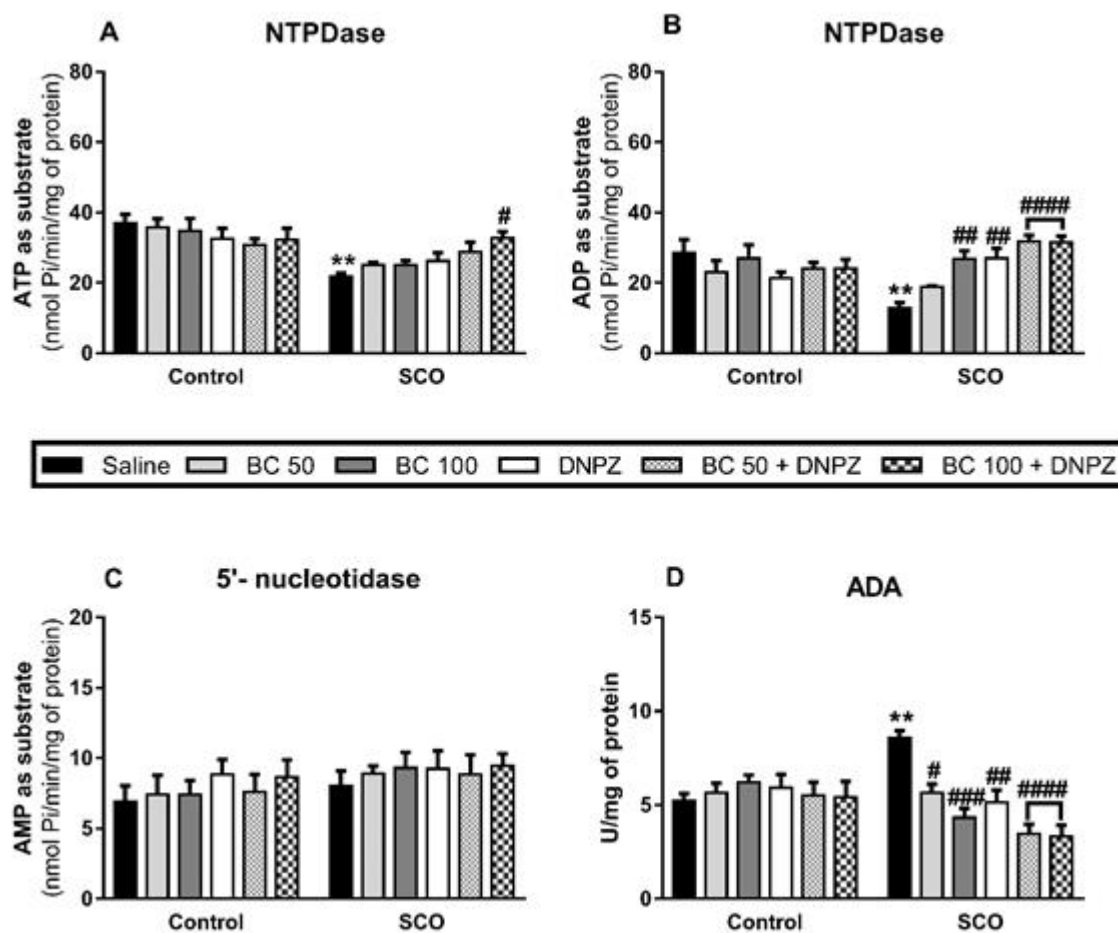


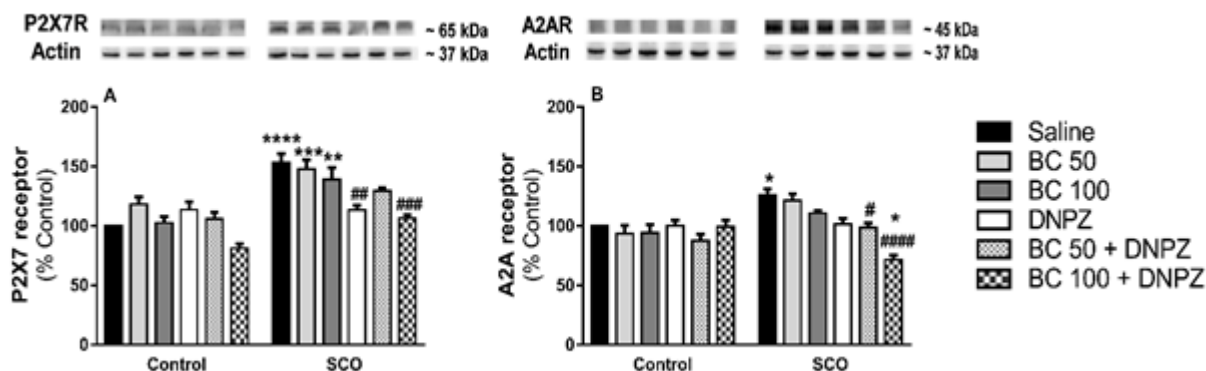
Figure 1. Schematic representation of the experimental protocol.



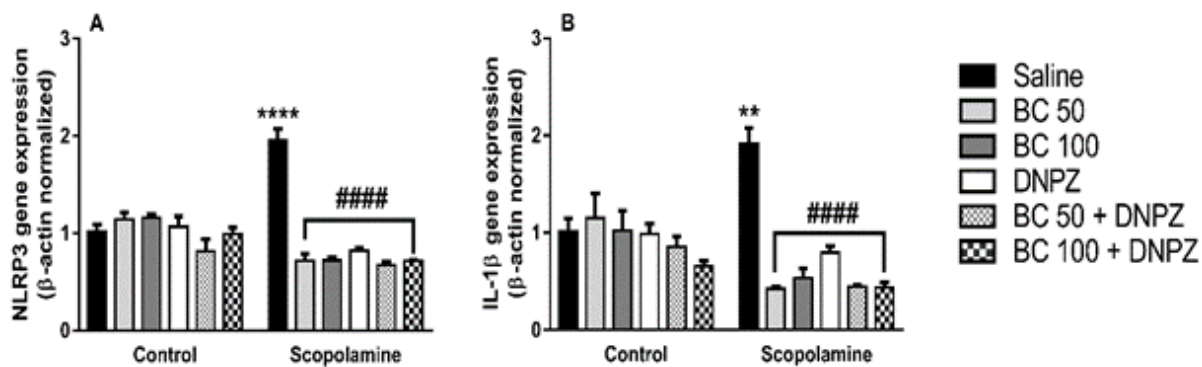
**Figure 2.** Effect of Blackcurrant (BC 50 or 100 mg/kg) and/or Donepezil (DNPZ 5 mg/kg) on spatial memory parameters in the probe trial of Morris Water Maze test in Scopolamine-induced (SCO 1 mg/kg) mice. (A) Number of crossings over the target quadrant. (B) Time spent in the target quadrant. (C) Time spent in the opposite quadrant. Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \* $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$  and \*\*\*\*  $P < 0.0001$  indicates a significant difference from the control group. #  $P < 0.05$  and ###  $P < 0.01$  indicates a significant difference from the SCO group. Bars represent mean  $\pm$  SEM (n=6-11).



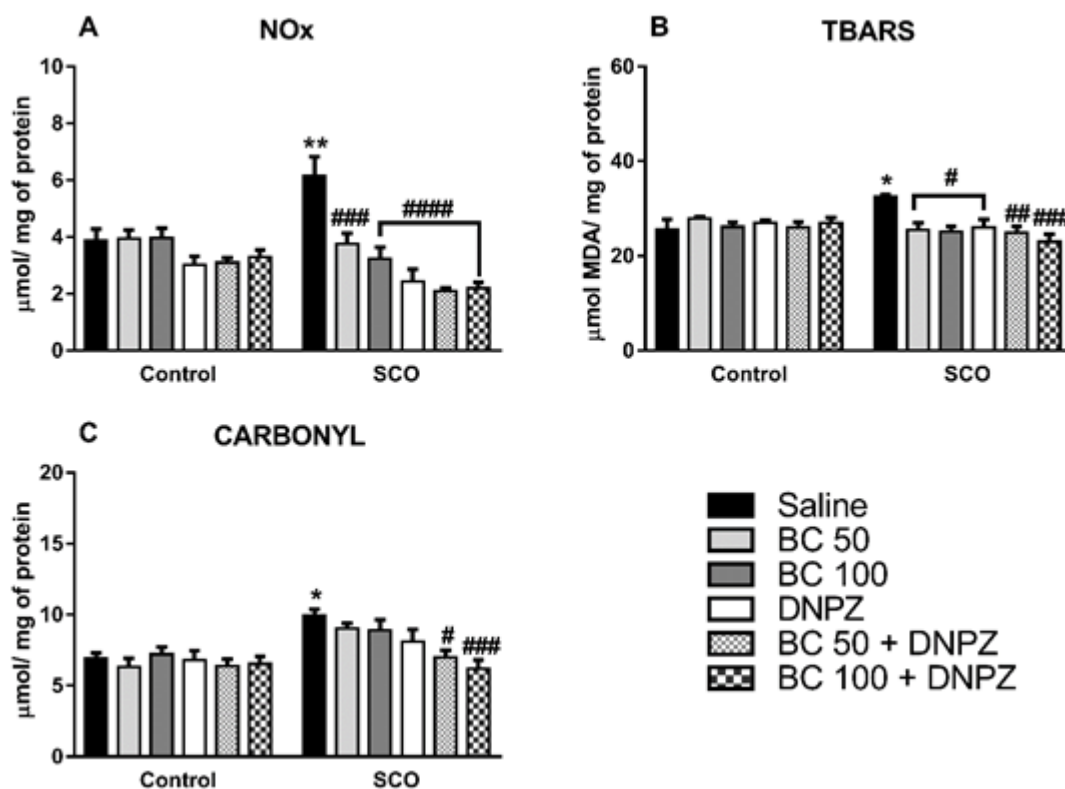
**Figure 3.** Effect of Blackcurrant (BC 50 or 100 mg/kg) and/or Donepezil (DNPZ 5 mg/kg) on NTPDase activity, using ATP (A) and ADP (B) as substrate, 5'-nucleotidase activity using AMP (C) as substrate and adenosine deaminase (ADA) activity in synaptosomes of the cerebral cortex of Scopolamine-induced (SCO 1 mg/kg) mice. Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \*\*  $P < 0.01$  indicates a significant difference from the control group. #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  and ####  $P < 0.0001$  indicates a significant difference from the SCO group. Bars represent mean  $\pm$  SEM (n=5-6).



**Figure 4.** P2X7 (A) and A2A (B) receptors densities by Western blot analysis in the cerebral cortex of Scopolamine-induced mice treated with (BC 50 or 100 mg/kg) and/or Donepezil (DNPZ 5 mg/kg). Actin loading control antibody was used to normalize the levels of protein. Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  and \*\*\*\*  $P < 0.0001$  indicates a significant difference from the control/saline group. #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  and ####  $P < 0.0001$  indicates a significant difference from the Scopolamine/saline group. Bars represent mean  $\pm$  SEM (n=3-4).

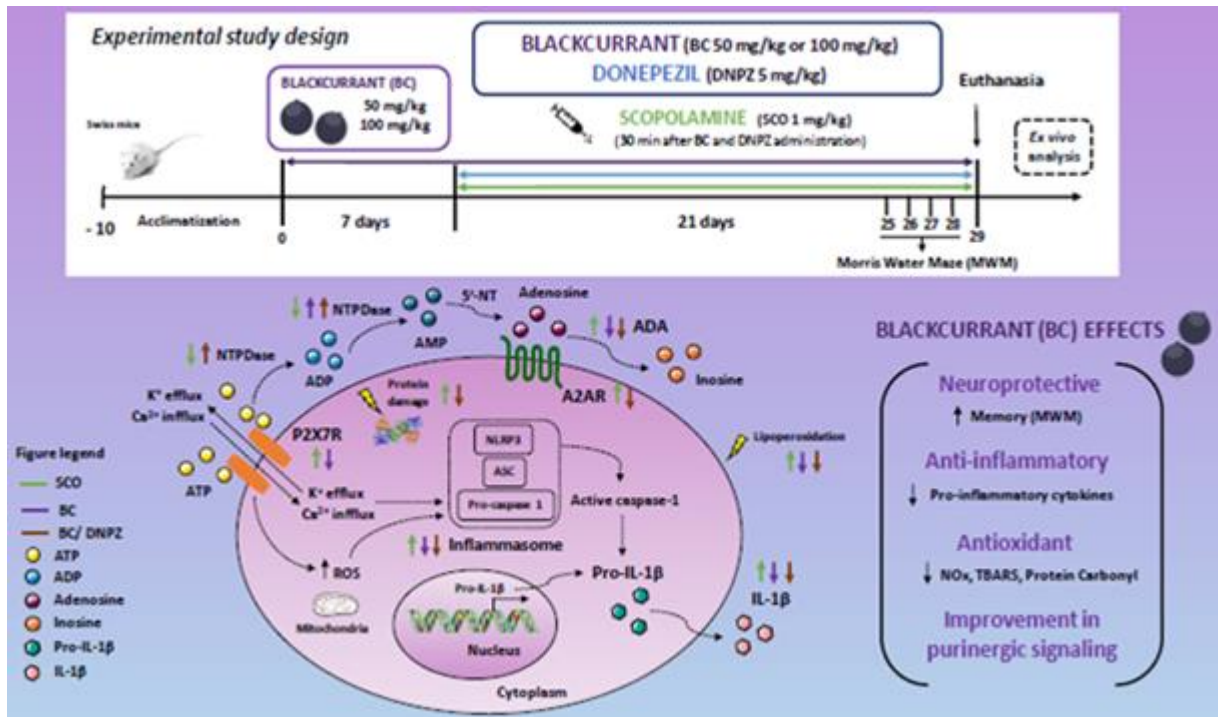


**Figure 5.** Gene expression profile of NLRP3 inflammasome (A) and IL-1 $\beta$  (B) in the cerebral cortex of Scopolamine-induced mice treated with (BC 50 or 100 mg/kg) and/or Donepezil (DNPZ 5 mg/kg). Gene expression was normalized by  $\beta$ -actin (ACTB) and performed using qRT-PCR. Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*\*  $P < 0.0001$  indicates a significant difference from the control group. ####  $P < 0.0001$  indicates a significant difference from the SCO group. Bars represent mean  $\pm$  SEM (n=3).



**Figure 6.** Effect of Blackcurrant (BC 50 or 100 mg/kg) and/or Donepezil (DNPZ 5 mg/kg) on NOx (A), TBARS (B) and protein carbonyl (C) levels in cerebral cortex of Scopolamine-induced (SCO 1 mg/kg) mice. Data were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey test. \*P < 0.05 and \*\* P < 0.01 indicates a significant difference from the control group. # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 and #### P < 0.0001 indicates a significant difference from the SCO group. Bars represent mean  $\pm$  SEM (n=4 -7).

GRAPHICAL ABSTRACT



## 5. DISCUSSÃO

O processo de envelhecimento vem acompanhado de grandes desafios com relação a saúde mental, uma vez que os déficits de memória, que podem ser observados com o avanço da idade, estão sendo prevalentemente associados a doenças crônicas neurodegenerativas, que causam deterioração progressiva da memória e distúrbios comportamentais na população idosa, tornando esse um problema de saúde global (WHO, 2019; 2015; UNITED NATIONS, 2017).

Neste contexto, acredita-se que os danos cognitivos decorrentes do envelhecimento ou associadas a demências, possam ser prevenidos por compostos naturais com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e neuroprotetoras. Diante do exposto, destaca-se a capacidade do cassis em melhorar a função neuronal, a qual é atribuída ao seu alto teor de antocianinas, em particular, a cianidina e a delphinidina, que compreendem aproximadamente 65% das antocianinas encontradas no extrato de cassis (GOPALAN et al., 2012; KARJALAINEN et al., 2009). Corroborando com essas evidências, SHIH et al. (2010) utilizaram esse extrato de na concentração de 50 mg/kg como controle positivo em um estudo para verificar a eficácia das antocianinas do Mulberry, demonstrando que essas moléculas bioativas atuam na proteção contra danos neuronais induzidos pelo envelhecimento, uma vez que melhorou a capacidade cognitiva de camundongos com senescência acelerada. Da mesma forma, o medicamento padrão Donepezil indicado para pacientes com DA, devido à inibição da AChE, também tem revelado reverter os déficits de memória em diferentes modelos de comprometimento cognitivo em animais (BARAI et al., 2018; BHUVANENDRAN et al., 2018; LINDNER et al., 2006). Convém salientar ainda, o importante envolvimento tanto do sistema colinérgico quanto da sinalização purinérgica nos processos de neurotransmissão, neuromodulação e na regulação de respostas inflamatórias, sendo alterações nas colinesterases e no metabolismo das purinas observados em diversas condições patológicas tais como: esclerose múltipla (POLACHINI et al., 2014), diabetes (REICHERT et al. 2018), toxoplasmose (BOTTARI et al. 2018) e outras doenças neurodegenerativas (BAGATINI et al., 2018; SILVA et al., 2014).

Consistente com essas evidências, o presente estudo investigou os efeitos neuroprotetores do cassis e de sua associação com o Donepezil sobre o comprometimento da memória e as alterações na neurotransmissão colinérgica e na sinalização purinérgica, bem como foram analisadas as respostas anti-inflamatórias e antioxidantes, comparando estes efeitos aos do Donepezil em um modelo de amnésia induzida pela administração crônica de escopolamina em camundongos. Os manuscritos presentes nessa tese, compartilham do mesmo protocolo experimental, no entanto no Manuscrito I os resultados do cassis são referentes



apenas a dose de 50 mg/kg, enquanto os resultados apresentados no Manuscrito II compreendem as doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg de cassis.

É importante ressaltar que a escopolamina, através de seus efeitos anticolinérgicos, pode causar danos à memória de forma temporária e reversível, tanto em estudos com animais, como em ensaios clínicos (BUCCAFUSCO, 2008). Desta forma, testes comportamentais, amplamente aplicados para analisar diferentes tipos de memória e outras funções cognitivas (BOTTON et al., 2010; D’HOOGHE; DE DEYN, 2001; LI et al., 2016), foram utilizados nesse estudo para validar os distúrbios cognitivos induzidos pela escopolamina e avaliar os efeitos anti-amnésicos do tratamento com cassis e/ou Donepezil.

Nossos resultados demonstraram que a administração crônica de escopolamina prejudicou a memória de trabalho no teste do labirinto em Y, assim como a MCD e a MLD avaliada pela tarefa de reconhecimento de objetos e exibiu danos à memória aversiva de longa duração no teste de esquiva inibitória. Ainda por meio do teste do labirinto aquático de Morris, verificamos que a escopolamina induziu déficits na aquisição e retenção da memória dos camundongos. Resultados semelhantes foram observados em estudos anteriores, os quais demonstraram a capacidade da escopolamina em induzir comprometimento em diferentes fases da aquisição da memória em roedores (BOTTON et al., 2010; KLINKENBERG; BLOKLAND, 2010b; LI et al., 2016).

Nosso estudo reproduziu um modelo bem estabelecido de amnésia, a administração de escopolamina durante 21 dias induziu déficits de memória nos animais, o qual está associado a inibição dos receptores colinérgicos muscarínicos, principalmente do tipo M1, prejudicando a neurotransmissão colinérgica nas regiões do córtex e hipocampo, as quais são essenciais no processo de aprendizagem e memória (KLINKENBERG; BLOKLAND, 2010b; SOARES; FORNARI; OLIVEIRA, 2006).

Em nosso estudo, o tratamento com cassis (50 mg/kg) e sua associação com Donepezil (5 mg/kg) preveniram os déficits na memória de trabalho no teste de labirinto em Y e a MCD e MLD no teste de reconhecimento de objetos nos animais neste modelo de amnésia por escopolamina, sendo esses resultados semelhantes ao tratamento apenas com Donepezil (5 mg/kg). Além disso, a associação do cassis com Donepezil também preveniu os prejuízos na aquisição da MLD no teste de esquiva inibitória induzidos por escopolamina. Em relação ao labirinto aquático de Morris, os tratamentos com cassis (50 ou 100 mg/kg) e/ou Donepezil (5 mg/kg) preveniram os déficits na aquisição e retenção da memória induzidos pela administração de escopolamina.

Ainda neste contexto, nosso trabalho indicou que nenhuma das condições experimentais afetaram a atividade locomotora espontânea dos animais, uma vez que não foram observados efeitos significativos nos parâmetros de locomoção analisados no teste de campo aberto e no labirinto aquático de Morris. Baseado nesses resultados, podemos constatar que o cassis (50 ou 100 mg/kg) e sua associação com o Donepezil (5 mg/kg) exerceram efeitos anti-amnésicos, os quais foram semelhantes ao tratamento com o medicamento padrão Donepezil (5 mg/kg), e excluindo a possibilidade de que a atividade locomotora possa ter exercido algum tipo de influência nos resultados obtidos.

Segundo a literatura, o cassis apresenta em torno de 250 mg de antocianinas/100g de frutas frescas (VAGIRI et al., 2015), sendo esses flavonoides capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e neutralizar eventos patológicos no SNC (ANDRES-LACUEVA et al., 2005). Em consonância com nosso estudo, alguns autores descobriram que os tratamentos com 200 mg/kg de antocianinas obtidas da casca da uva restauram os déficits de memória induzidos por estreptozotocina avaliados pelo teste de reconhecimento de objetos (PACHECO et al., 2018) e através da esQUIVA inibitória em ratos (GUTIERRES et al., 2014b). Segundo HONG et al. (2018) a administração de extrato ou vinagre de mirtilo, rico em antocianinas, melhorou a memória de camundongos após uma única injeção de escopolamina no teste de labirinto em Y. Além disso, a suplementação de antocianinas reverte déficits de memória relacionados à idade avaliadas pelo labirinto aquático de Morris (ANDRES-LACUEVA et al., 2005; REHMAN et al., 2017).

Vale salientar que a escopolamina, em alguns aspectos, mimetiza os déficits de memória observados no envelhecimento e nos estágios iniciais da DA, os quais estão associados a um desequilíbrio no sistema colinérgico, que causam uma redução nos níveis de ACh cerebral (KLINKENBERG; BLOKLAND, 2010a). Alterações nas enzimas envolvidas na síntese ou hidrólise da ACh têm sido consideradas importantes parâmetros fisiopatológicos em muitas doenças (GUO et al., 2016; PEPEU; GIOVANNINI, 2010; POLACHINI et al., 2014). Sendo assim, observamos que a administração crônica de escopolamina aumentou não somente as atividades das enzimas AChE e BChE, mas também a expressão gênica e densidade proteica da AChE no córtex cerebral e no hipocampo, bem como causou uma redução da expressão de ChAT somente no hipocampo, corroborando com os dados da literatura (GUO et al., 2016; HONG et al., 2018; PARK et al., 2016). Curiosamente, um estudo mostra que a atividade e a expressão da ChAT, enzima responsável pela síntese de ACh é maior no hipocampo, demonstrando que as estruturas cerebrais possuem heterogeneidade na quantidade de neurônios

e projeções colinérgicas, o que pode resultar em respostas distintas (DAS; DIKSHIT; NATH, 2001; HAWLEY et al., 2015; MESULAM et al., 2002).

Conforme estudos anteriores, as antocianinas, em geral, possuem a capacidade de restaurar a atividade da AChE em cérebro de animais em diferentes modelos de DA (GUTIERRES et al., 2014b; HONG et al., 2018; PACHECO et al., 2018). No presente trabalho, o tratamento com cassis (50 mg/kg) e/ou a associação com o Donepezil preveniram o aumento da atividade, densidade e expressão gênica da AChE induzido por escopolamina em córtex cerebral e hipocampo. A administração de Donepezil (5 mg/kg) também inibiu tanto a atividade como a expressão e a densidade desta enzima, o que era esperado, visto que é um fármaco inibidor reversível da AChE e foi desenvolvido para melhorar a memória, pois mantém os níveis de ACh, diminuindo a taxa de degradação desse neurotransmissor (ATUKEREN et al., 2017). A estrutura do Donepezil possui uma subunidade indanona e uma N-benzilpiperidina, sendo essa última responsável pela inibição da enzima. O grupamento benzil interage com os resíduos de triptofano (Trp84) no fundo da cavidade catalítica da enzima, enquanto a piperidina interage com os resíduos de tirosina (Tyr70) no sítio aniônico periférico (SAXENA et al., 2003). É importante mencionar que os inibidores da AChE tem ação nas fases leve a moderada da DA, todavia esse efeito terapêutico é parcial e o número de pacientes que não respondem ao tratamento é grande, além de apresentarem reações adversas, como distúrbios do sono, problemas gastrointestinais e cardiovasculares (PEPEU; GIOVANNINI, 2010).

Outro efeito observado refere-se a atividade da BChE, estudos mostram que a BChE co-regula a neurotransmissão colinérgica, tendo assim um relevante papel no desenvolvimento e progressão da DA (BARAI et al., 2018; GREIG; LAHIRI; SAMBAMURTI, 2002a). O tratamento com cassis (50 mg/kg) e/ou a associação com o Donepezil impediu o aumento da atividade da BChE induzido por escopolamina. Contudo, o tratamento com o medicamento padrão Donepezil (5 mg/kg) não inibiu significativamente a atividade da BChE em ambas estruturas cerebrais analisadas, corroborando com dados apresentados na literatura, que mostram sua alta seletividade para a AChE e não para a BChE (DA SILVA et al., 2006). Ainda, a expressão da ChAT foi aumentada pelo cassis (50 mg/kg) e sua associação com o Donepezil no hipocampo, o que não foi observado no tratamento com o Donepezil (5 mg/kg) livre. De acordo com os resultados, o cassis (50 mg/kg) e sua associação com Donepezil podem prevenir os déficits de memória através da modulação do sistema colinérgico, não somente pela diminuição da atividade e expressão da AChE, mas também inibindo a atividade da BChE, e ainda podem aumentar a expressão da ChAT no cérebro, sendo os resultados sobre as enzimas BChE e ChAT mais significativos que o tratamento com o medicamento padrão.

Conforme mencionado anteriormente, além de alterações na transmissão colinérgica, algumas condições patológicas como a DA podem estar associadas a disfunções na sinalização purinérgica (BAGATINI et al., 2018). Essa sinalização tem uma participação chave no SNC, sendo o ATP e a adenosina importantes moléculas que modulam processos relacionados à aprendizagem e a memória (ABBRACCHIO et al., 2009). Além disso, as ectonucleotidases ancoradas à membrana celular regulam os níveis extracelulares dos nucleotídeos e nucleosídeo de adenina. Portanto, alterações nas atividades dessas enzimas e, conseqüentemente, nos níveis de ATP e adenosina podem levar ao declínio dos processos cognitivos (BAGATINI et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2019; GUTIERRES et al., 2012).

Nesse sentido, os resultados revelaram que a administração crônica de escopolamina inibiu a atividade da NTPDase atuando na hidrólise de ATP e ADP em sinaptossomas do córtex cerebral. No entanto, a escopolamina não alterou a atividade da 5'-nucleotidase. Em conformidade com esses dados, alguns estudos também demonstraram que uma redução na hidrólise do ATP induzida pela escopolamina, o que pode aumentar os níveis de ATP extracelular na fenda sináptica (ADEMILUYI; OGUNSUYI; OBOH, 2016; MARISCO et al., 2013).

No SNC, o ATP tem ação pró-inflamatória e pró-apoptótica (CIEŚLAK; WOJTCZAK, 2018). Os níveis aumentados de ATP extracelular ativam o P2X7R, que é acoplado a canais catiônicos não seletivos. O ATP se liga ao P2X7R e promove o influxo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  e o efluxo de  $\text{K}^+$ , o que leva à despolarização mitocondrial e da membrana plasmática e a produção de espécies reativas. A ativação do P2X7R e o efluxo de  $\text{K}^+$ , também ativam a panx-1. Nas células imune do SNC, as respostas funcionais mediadas pelo P2X7R e a panx 1 estão associadas à formação e ativação do inflamassoma NLRP3, que desempenha um papel crucial na regulação da resposta imune inata (DI VIRGILIO, 2007). O inflamassoma NLRP3 se forma em resposta a sinais de perigo endógenos como baixos níveis intracelulares de  $\text{K}^+$  e também está associado a danos em tecidos causados pelas espécies reativas. Após o inflamassoma ativa a caspase-1, que por sua vez, induz a conversão da pró-IL-1 $\beta$  inativa em uma forma madura da interleucina pró-inflamatória, a IL-1 $\beta$ , a qual é secretada pelas células (BROZ; DIXIT, 2016; WEI et al., 2019). A estimulação prolongada do P2X7R causa uma liberação maciça de mediadores pró-inflamatórios e induz a morte celular por apoptose via ATP, o que corrobora com níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias em pacientes e em animais no modelo DA (DI VIRGILIO; ADINOLFI, 2017; ERB et al., 2019). De maneira muito interessante, nesse estudo, verificamos que a escopolamina induziu um aumento na densidade do P2X7R e na expressão do inflamassoma NLRP3 e da IL-1 $\beta$  no córtex cerebral. Em vista disso, podemos sugerir que a

administração crônica de escopolamina estimula a neuroinflamação, que contribui para disfunção, lesão e morte neuronal, sendo assim relacionada aos prejuízos cognitivo (GHUMATKAR et al., 2015; ROJO et al., 2008).

De acordo com a literatura, as antocianinas possuem a capacidade de modular as atividades das enzimas purinérgicas (GUTIERRES et al., 2012). Em nosso trabalho verificou-se que o tratamento com cassis (50 ou 100 mg/kg) e/ou Donepezil (5 mg/kg) preveniu os efeitos da escopolamina sobre a hidrólise do ATP e ADP. Além disso, o Donepezil (5 mg/kg) e a associação do cassis (100 mg/kg) com Donepezil reduziram a densidade do P2X7R. Esse resultado demonstra uma melhor resposta da associação dos tratamentos na modulação das enzimas, principalmente na maior dose, o que poderia manter as concentrações extracelulares do ATP. Ademais, todos os tratamentos preveniram o aumento da expressão do inflamassoma NLRP3 e da IL-1 $\beta$  induzidas por escopolamina, demonstrando a capacidade anti-inflamatória do cassis e do medicamento padrão Donepezil (YOSHIYAMA et al., 2010).

Com relação a atividade da ADA, nossos resultados demonstraram que a escopolamina aumentou a atividade dessa enzima em sinaptossomas de córtex cerebral, o que promoveu uma rápida hidrólise da adenosina em inosina. Sabe-se que a adenosina é uma molécula associada à neuromodulação, regulação homeostática e neuroproteção do SNC, impedindo dano neuronal, o que é importante na modulação dos processos patológicos, como a neurodegeneração, sendo assim, sua depleção pode comprometer a formação da memória (CIEŚLAK; WOJTCZAK, 2018; ERB et al., 2019). Em contrapartida, os tratamentos com cassis (50 ou 100 mg/kg) e/ou Donepezil (5 mg/kg) foram capazes de prevenir o aumento da atividade da ADA induzida por escopolamina. Estudos têm demonstrado que a modulação dos níveis de adenosina através da inibição da ADA restaura os déficits cognitivos induzido por escopolamina (BORTOLOTTO et al., 2015). Similarmente, GUTIERRES et al. (2012), revelaram que as antocianinas obtidas da casca da uva também reduziram a atividade da ADA em modelo de amnésia induzida por escopolamina, mas essas alterações foram encontradas apenas em sinaptossomas de hipocampo.

Os efeitos biológicos da adenosina no cérebro são mediados, principalmente, pela ativação de receptores de alta afinidade, como o A2AR, os quais podem estar alterados em condições patológicas. Estudos mostram que estímulos nocivos a longo prazo para o cérebro aumentam a densidade e eficiência dos receptores A2A, conforme observado em modelos de doenças neurodegenerativas (CUNHA, 2005; GIMÉNEZ-LLORT et al., 2007; RAHMAN, 2009). Neste estudo, observamos que a associação do cassis (50 ou 100 mg/kg) com o Donepezil preveniram o aumento da densidade do A2AR no córtex cerebral induzida por

escopolamina, sendo a associação do cassis 100 mg/kg com o Donepezil mais eficiente, o que poderia contribuir para a prevenção dos déficits de memória. Algumas evidências sugerem que o bloqueio do A2AR por antagonistas reduz a neuroinflamação, prevenindo o recrutamento de micróglia ativada e a disfunção neuronal (PAGNUSSAT et al., 2015; REBOLA et al., 2011; TAKAHASHI; PAMPLONA; PREDIGER, 2008).

Estudos têm evidenciado que além de mecanismos colinérgicos e purinérgicos envolvidos na deterioração da memória, a escopolamina induz modificações oxidativas no tecido cerebral, sendo considerados fatores de risco para amnésia e também envolvidos na patogênese da DA. Em nossa investigação, a escopolamina promoveu um aumento nos níveis de espécies reativas no córtex e no hipocampo, bem como em outros parâmetros oxidativos como o NOx, TBARS e proteínas carbonil no córtex cerebral. De acordo com esses achados, podemos verificar que a escopolamina induz uma produção excessiva de ERO e ERN, gerando um aumento na peroxidação lipídica e oxidação de proteínas celulares. Esses agentes oxidantes podem estimular diretamente as vias apoptóticas, consideradas uma das principais causas de neurodegeneração. Segundo XU et al. (2016), a escopolamina aumenta a expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax e Caspase-3 e regula negativamente a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl2. Além disso, o estresse oxidativo pode aumentar a expressão do inflamassoma NLRP3 e da IL-1 $\beta$  causando neuroinflamação (WEI et al., 2019)

Assim, a administração de escopolamina também induziu um comprometimento no sistema de defesa antioxidante, reduzindo a atividade das enzimas GR, GST e GPx e uma diminuição dos níveis de NPSH no córtex cerebral e no hipocampo. Em vista disto, ocorre um desequilíbrio na homeostase redox, uma vez que há uma redução dos níveis de GSH, que é o NPSH mais prevalente nas células animais e atua na neutralização dos radicais livres, levando a uma redução na atividade das glutatônicas e na detoxificação de peróxidos de hidrogênio, contribuindo para o aumento do estresse oxidativo (COUTO; WOOD; BARBER, 2016). Sendo esses resultados consistentes com estudos que sugerem que uma diminuição no sistema redox das glutatônicas, prejudica a remoção das espécies reativas, o que desencadeia alterações nas membranas biológicas, comprometendo as atividades de enzimas ligadas a membrana e induzindo vulnerabilidade neural (DE OLIVEIRA et al., 2019; MARISCO et al., 2013).

Os resultados mostraram que o cassis e/ou Donepezil foram capazes de prevenir os efeitos pró-oxidantes induzidos pela escopolamina. O tratamento com cassis (50 mg/kg) e/ou Donepezil reduziu os níveis de espécies reativas, bem como aumentou as atividades de GR, GST e GPx, e dos níveis de NPSH no córtex cerebral e no hipocampo. Além disso, observou-se que os tratamentos com cassis (50 ou 100 mg/kg) e/ou Donepezil reduziram os níveis de

NOx e TBARS, e a associação de ambas as doses do cassis com o Donepezil diminui a carbonilação proteica no córtex cerebral. As antocianinas possuem a capacidade de neutralizar diretamente os radicais livres, em virtude de sua estrutura ser formada por um anel de pirano, no qual os grupos hidroxilas doam átomos de hidrogênio aos radicais livres (PACHECO et al., 2018). O cassis também modulou a ação de enzimas antioxidantes, reduzindo as ERO endógenas e prevenindo danos oxidativos às membranas biológicas (SHIH et al., 2010; VEPSÄLÄINEN et al., 2013). O medicamento padrão Donepezil também preveniu danos oxidativos cerebrais em modelos de DA, mostrando que além de seu papel na inibição da atividade da AChE, possui atividades antioxidantes e anti-apoptóticas (ATUKEREN et al., 2017; MARTINI et al., 2018; XU et al., 2016). Esses resultados evidenciam que a capacidade anti-amnésica do cassis e do Donepezil também está relacionada as suas propriedades antioxidantes.

## 6. CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- A partir dos testes comportamentais realizados, os tratamentos com cassis e/ou Donepezil apresentaram propriedades neuroprotetoras, pois preveniram os déficits de memória induzidos pela administração crônica de escopolamina, demonstrando que poderiam ser utilizados para prevenir ou amenizar danos cognitivos causados por doenças neurodegenerativas.
- O tratamento com cassis (50 mg/kg) e sua associação com o Donepezil preveniu os danos na memória induzidos pela escopolamina através da modulação da atividade, expressão e densidade das enzimas colinérgicas e potencial restauração dos níveis de ACh. Efeitos similares sobre a AChE foram observados no tratamento com o medicamento padrão Donepezil, contudo não foi eficiente em prevenir as alterações sobre a BChE e ChAT. Sugerindo que a associação de ambos os tratamentos pode ter uma ação mais ampla e eficaz na prevenção do comprometimento da neurotransmissão colinérgica.
- A inibição da atividade das NTPDases pela administração de escopolamina pode aumentar a concentração de ATP extracelular e a expressão do P2X7R. Esses efeitos podem induzir um aumento da expressão do inflamassoma NLRP3 e na IL-1 $\beta$ , indicando um possível mecanismo de neuroinflamação, também responsável pelo comprometimento da memória. O cassis (50 ou 100 mg/kg) e/ou Donepezil, especialmente a associação de ambos os tratamentos, preveniram as alterações na sinalização purinérgica exercendo uma resposta anti-inflamatória;
- O aumento da atividade da ADA e da expressão do A2AR podem estar associados a uma redução nos níveis de adenosina e ao surgimento dos déficits de memória. Contudo, os tratamentos com cassis (50 ou 100 mg/kg) e/ou Donepezil preveniram essas alterações induzidas por escopolamina.



- O estresse oxidativo é um dos mecanismos envolvidos na indução dos déficits de memória por escopolamina. Em nosso estudo, os tratamentos com cassis e/ou Donepezil foram capazes de neutralizar as ERO e ERN, prevenindo a redução do sistema de defesa antioxidante das glutatonas e o aumento da peroxidação lipídica e da carbonilação proteica, evidenciando que suas propriedades antioxidantes podem prevenir danos neuronais e o comprometimento da memória.

Baseado nas conclusões acima, pode-se observar um efeito neuroprotetor do cassis e de sua associação com o Donepezil nesse modelo de amnésia induzida por escopolamina. Através dessas evidências o cassis pode ser considerado um promissor agente terapêutico adjuvante na prevenção dos déficits de memória.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAIS, J. M. et al. Redox Regulation of NLRP3 Inflammasomes: ROS as Trigger or Effector? **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 22, n. 13, p. 1111–1129, maio 2015.
- ABBASI, M. A. et al. Curcumin and its derivatives: Moderate inhibitors of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and trypsin. **Scientia Iranica**, v. 19, n. 6, p. 1580–1583, dez. 2012.
- ABBRACCHIO, M. P. et al. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 1, p. 19–29, jan. 2009.
- ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval Abel and Lattal 181. n. 1, p. 180–187, 2001.
- ADEMILUYI, A. O.; OGUNSUYI, O. B.; OBOH, G. Alkaloid extracts from Jimson weed (*Datura stramonium* L.) modulate purinergic enzymes in rat brain. **NeuroToxicology**, v. 56, p. 107–117, set. 2016.
- AGIS-TORRES, A. et al. Multi-Target-Directed Ligands and other Therapeutic Strategies in the Search of a Real Solution for Alzheimer's Disease. **Current Neuropharmacology**, v. 12, n. 1, p. 2–36, 31 jan. 2014.
- ALDUNATE, R. et al. Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. **Brain Research Reviews**, v. 47, n. 1–3, p. 96–104, dez. 2004.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. **ALZHEIMER'S DISEASE FACTS AND FIGURES Includes a Special Report on Alzheimer's Detection in the Primary Care Setting: Connecting Patients and Physicians**. Disponível em: <<https://www.alz.org/media/Documents/alzheimers-facts-and-figures-2019-r.pdf>>. Acesso em: 30 jun. 2019.
- AMEEN-ALI, K. E.; EASTON, A.; EACOTT, M. J. Moving beyond standard procedures to assess spontaneous recognition memory. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 53, p. 37–51, jun. 2015.
- AMENTA, F.; TAYEBATI, S. Pathways of Acetylcholine Synthesis, Transport and Release as Targets for Treatment of Adult-Onset Cognitive Dysfunction. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 488–498, 1 fev. 2008.
- ANAND, R.; GILL, K. D.; MAHDI, A. A. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 27–50, jan. 2014.
- ANDRES-LACUEVA, C. et al. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. **Nutritional Neuroscience**, v. 8, n. 2, p. 111–120, 5 abr. 2005.
- ANTONIOLI, L. et al. Adenosine Deaminase in the Modulation of Immune System and its Potential as a Novel Target for Treatment of Inflammatory Disorders. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 6, p. 842–862, 1 maio 2012.

- ANTOR, M. A. et al. The effect of transdermal scopolamine for the prevention of postoperative nausea and vomiting. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, 9 abr. 2014.
- AQUILANO, K.; BALDELLI, S.; CIRIOLO, M. R. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, 26 ago. 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALZHEIMER- ABRAZ. **O QUE É ALZHEIMER**. Disponível em: <<http://abraz.org.br/web/sobre-alzheimer/o-que-e-alzheimer/>>. Acesso em: 28 jun. 2019.
- ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 2015.
- ATUKEREN, P. et al. The efficacy of donepezil administration on acetylcholinesterase activity and altered redox homeostasis in Alzheimer's disease. **Biomed Pharmacother**, v. 90, p. 786–795, 2017.
- AYAZ, M. et al. Flavonoids as Prospective Neuroprotectants and Their Therapeutic Propensity in Aging Associated Neurological Disorders. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 11, p. 155, 2019.
- BADDELEY, A. Working Memory: Theories, Models, and Controversies. **Annual Review of Psychology**, v. 63, n. 1, p. 1–29, 10 jan. 2012.
- BAGATINI, M. D. et al. The Impact of Purinergic System Enzymes on Noncommunicable, Neurological, and Degenerative Diseases. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, p. 1–21, 2018.
- BALDIOTI, F. **Groselha negra tem propriedades que prometem fazer milagres na pele e nos cabelos**. Disponível em: <<https://oglobo.globo.com/ela/beleza/groselha-negra-tem-propriedades-que-prometem-fazer-milagres-na-pele-nos-cabelos-16952574>>. Acesso em: 28 jun. 2019.
- BARAI, P. et al. Neuroprotective effects of *Bergenia ciliata* on NMDA induced injury in SH-SY5Y cells and attenuation of cognitive deficits in scopolamine induced amnesia in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 374–390, dez. 2018.
- BARBÉ, F.; DOUGLAS, T.; SALEH, M. Advances in Nod-like receptors (NLR) biology. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 6, p. 681–697, dez. 2014.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BARTUS, R. T. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. **Exp Neurol**, v. 163, n. 2, p. 495–529, 2000.
- BEATTIE, J.; CROZIER, A.; DUTHIE, G. Potential Health Benefits of Berries. **Current Nutrition & Food Science**, v. 1, n. 1, p. 71–86, 1 jan. 2005.

BENN, T. et al. Polyphenol-rich blackcurrant extract prevents inflammation in diet-induced obese mice. **J Nutr Biochem**, v. 25, n. 10, p. 1019–1025, 2014.

BHUVANENDRAN, S. et al. Amelioration of Cognitive Deficit by Embelin in a Scopolamine-Induced Alzheimer's Disease-Like Condition in a Rat Model. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 25 jun. 2018.

BIANCHI, V.; SPYCHALA, J. Mammalian 5'-Nucleotidases. **Journal of Biological Chemistry**, p. 46195–8, 2003.

BONINI, M. G. et al. Redox control of enzymatic functions: The electronics of life's circuitry. **IUBMB Life**, v. 66, n. 3, p. 167–181, mar. 2014.

BONNER, L. T.; PESKIND, E. R. Pharmacologic treatments of dementia. **Medical Clinics of North America**, v. 86, n. 3, p. 657–674, maio 2002.

BORTOLOTTO, J. W. et al. Modulation of adenosine signaling prevents scopolamine-induced cognitive impairment in zebrafish. **Neurobiology of Learning and Memory**, 2015.

BOTTARI, N. B. et al. Resveratrol-mediated reversal of changes in purinergic signaling and immune response induced by *Toxoplasma gondii* infection of neural progenitor cells. **Purinergic Signalling**, v. 15, n. 1, p. 77–84, 2019.

BOTTON, P. H. et al. Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. **Behavioural Brain Research**, v. 214, n. 2, p. 254–259, dez. 2010.

BRENNAN, R. M. Currants and gooseberries. In: JAMES F. HANCOCK (Ed.). **Temperate Fruit Crop Breeding: Germplasm to Genomics**. East Lansing: Springer, Dordrecht, 2008. p. 177–196.

BROWN, D. A. Muscarinic Acetylcholine Receptors (mAChRs) in the Nervous System: Some Functions and Mechanisms. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 41, n. 3, p. 340–346, 6 jul. 2010.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 7, p. 407–420, 13 jul. 2016.

BUCCAFUSCO, J. The Revival of Scopolamine Reversal for the Assessment of Cognition-Enhancing Drugs. In: BUCCAFUSCO JJ (Ed.). **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**. 2. ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2008. p. 329–343.

BUDZYNSKA, B. et al. Effects of imperatorin on scopolamine-induced cognitive impairment and oxidative stress in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 232, n. 5, p. 931–942, 2015.

BURGESS, N.; MAGUIRE, E. A.; O'KEEFE, J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. **Neuron**, v. 35, n. 4, p. 625–41, 15 ago. 2002.

BURNSTOCK, G. Do some nerve cells release more than one transmitter? **Neuroscience**, v.

1, n. 4, p. 239–248, ago. 1976.

BURNSTOCK, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 3, p. 166–176, mar. 2006a.

BURNSTOCK, G. Pathophysiology and Therapeutic Potential of Purinergic Signaling. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 1, p. 58–86, mar. 2006b.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: past, present and future. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 1, p. 3–8, 3 out. 2008.

BURNSTOCK, G. An introduction to the roles of purinergic signalling in neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration. **Neuropharmacology**, v. 104, p. 4–17, maio 2016.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems. **International Review of Cytology**, v. 240, p. 31–304, 2004.

BUTTERFIELD, D. A.; BOYD-KIMBALL, D. Amyloid  $\beta$ -Peptide(1-42) Contributes to the Oxidative Stress and Neurodegeneration Found in Alzheimer Disease Brain. **Brain Pathology**, v. 14, n. 4, p. 426–432, 5 abr. 2006.

BUTTERFIELD, D. A.; PERLUIGI, M.; SULTANA, R. Oxidative stress in Alzheimer's disease brain: new insights from redox proteomics. **Eur J Pharmacol**, v. 545, n. 1, p. 39–50, 2006.

CAHILL, L.; MCGAUGH, J. L. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. **Trends in Neurosciences**, v. 21, n. 7, p. 294–299, jul. 1998.

CAN, M. V. et al. *Willughbeia cochinchinensis* prevents scopolamine-induced deficits in memory, spatial learning, and object recognition in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 214, p. 99–105, mar. 2018.

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

CARDOSO, A. M. et al. Impact of ectonucleotidases in autonomic nervous functions. **Autonomic Neuroscience**, v. 191, p. 25–38, set. 2015.

CAUWELS, A. et al. Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality. **Cell Death & Disease**, v. 5, n. 3, p. e1102–e1102, 6 mar. 2014.

CHEN, J.-F. Adenosine Receptor Control of Cognition in Normal and Disease. **International Review of Neurobiology**, v. 119, p. 257–307, 2014.

CHETELAT, G.; BARON, J.-C. Early diagnosis of Alzheimer's disease: contribution of structural neuroimaging. **NeuroImage**, v. 18, n. 2, p. 525–41, fev. 2003.

CIEŚLAK, M.; WOJTCZAK, A. Role of purinergic receptors in the Alzheimer's disease. **Purinergic Signalling**, v. 14, n. 4, p. 331–344, 25 dez. 2018.

COKUGRAS, A. N. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. **Turkish Journal of Biochemistry**, n. 1303–829X, 2003.

CONN, P. J.; JONES, C. K.; LINDSLEY, C. W. Subtype-selective allosteric modulators of muscarinic receptors for the treatment of CNS disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 3, p. 148–155, mar. 2009.

COURTNEY, C. et al. Long-term donepezil treatment in 565 patients with Alzheimer's disease (AD2000): randomised double-blind trial. **Lancet**, v. 363, n. 9427, p. 2105–2115, 2004.

COUTO, N.; WOOD, J.; BARBER, J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. **Free Radic Biol Med**, v. 95, p. 27–42, 2016.

COX, B. C. et al. Transport of multiple nicotinic acetylcholine receptors in the rat optic nerve: high densities of receptors containing  $\alpha 6$  and  $\beta 3$  subunits. **Journal of Neurochemistry**, v. 105, n. 5, p. 1924–1938, jun. 2008.

CRAIG, L.A.; HONG, N.S.; MCDONALD, R.J. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 35, n. 6, p. 1397–409, mai. 2011.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 1001, 2009.

CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry international**, v. 38, n. 2, p. 107–25, fev. 2001.

CUNHA, R. A. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A receptor blockade. **Purinergic Signalling**, v. 1, n. 2, p. 111–134, 17 jun. 2005.

D'HOOGE, R.; DE DEYN, P. P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 36, n. 1, p. 60–90, 2001.

DA COSTA, P. et al. Curcumin attenuates memory deficits and the impairment of cholinergic and purinergic signaling in rats chronically exposed to cadmium. **Environmental Toxicology**, v. 32, n. 1, 2017.

DA SILVA, C. H. et al. Molecular modeling, docking and ADMET studies applied to the design of a novel hybrid for treatment of Alzheimer's disease. **J Mol Graph Model**, v. 25, n. 2, p. 169–175, 2006.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1–2, p. 23–38, mar. 2003

DAS, A.; DIKSHIT, M.; NATH, C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. **Life Sci**, v. 68, n. 13, p. 1545–1555, 2001.

DE CANDIA, M. et al. New azepino[4,3-b]indole derivatives as nanomolar selective inhibitors of human butyrylcholinesterase showing protective effects against NMDA-induced neurotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 125, p. 288–298, jan. 2017.

DE OLIVEIRA, J. S. et al. Neuroprotective effects of berberine on recognition memory impairment, oxidative stress, and damage to the purinergic system in rats submitted to intracerebroventricular injection of streptozotocin. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 2, p. 641–655, fev. 2019.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 4, p. 316–328, ago. 2005.

DERE, E.; HUSTON, J. P.; DE SOUZA SILVA, M. A. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 5, p. 673–704, 2007.

DHEIN, S.; VAN KOPPEN, C. J.; BRODDE, O.-E. Muscarinic receptors in the Mammalian Heart. **Pharmacological Research**, v. 44, n. 3, p. 161–182, set. 2001.

DI VIRGILIO, F. Liaisons dangereuses: P2X7 and the inflammasome. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 28, n. 9, p. 465–472, 2007.

DI VIRGILIO, F.; ADINOLFI, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. **Oncogene**, v. 36, n. 3, p. 293–303, 2017.

DÍAZ-HERNÁNDEZ, M. et al. Co-localisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. **Neuropharmacology**, v. 42, n. 1, p. 20–33, jan. 2002.

DILORETO, R.; MURPHY, C. T. The cell biology of aging. **Molecular Biology of the Cell**, v. 26, n. 25, p. 4524–4531, 15 dez. 2015.

DMITRIEV, L. F.; TITOV, V. N. Lipid peroxidation in relation to ageing and the role of endogenous aldehydes in diabetes and other age-related diseases. **Ageing Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 200–210, abr. 2010.

DOBRANSKY, T. et al. Expression, purification and characterization of recombinant human choline acetyltransferase: phosphorylation of the enzyme regulates catalytic activity. **Biochemical Journal**, v. 349, n. 1, p. 141–151, 1 jul. 2000.

DONG, Y. et al. Patterns of neuropsychological impairment in Alzheimer's disease and mixed dementia. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 333, n. 1–2, p. 5–8, out. 2013.

DOOLEY, M.; LAMB, H. M. Donepezil: a review of its use in Alzheimer's disease. **Drugs & Aging**, v. 16, n. 3, p. 199–226, mar. 2000.

ELTZSCHIG, H. K. Adenosine: An Old Drug Newly Discovered. **Anesthesiology**, v. 111, n. 4, p. 904–915, out. 2009.

ERB, L. et al. Purinergic signaling in Alzheimer's disease. **Brain Research Bulletin**, v. 151, p. 25–37, 2019.

FIELDS, R. D.; BURNSTOCK, G. **Purinergic signalling in neuron-glia interactions** *Nature Reviews Neuroscience*, 2006.

FILLIT, H. M. et al. Recommendations for best practices in the treatment of Alzheimer's disease in managed care. **The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy**, v. 4, p. S9–S24, jan. 2006.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, n. 1–2, p. 1–12, fev. 2009.

FREDHOLM, B. B. et al. Adenosine and Brain Function. **International Review of Neurobiology**, v. 63, p. 191–270, 2005.

FREDHOLM, B. B. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 1, p. 1–34, mar. 2011.

FROTA, N. A. F. et al. Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer. **Dement Neuropsychol**, v. 5, p. 5–10, 2011.

FUJII, T.; TAKADA-TAKATORI, Y.; KAWASHIMA, K. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy. **Journal of pharmacological sciences**, v. 106, n. 2, p. 186–92, fev. 2008.

FÜRSTENAU, C. R. et al. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: Kinetic characterization and biochemical properties. **Platelets**, v. 17, n. 2, p. 84–91, 7 jan. 2006.

GAUTHIER, S. Cholinergic Adverse Effects of Cholinesterase Inhibitors in Alzheimer's Disease. **Drugs & Aging**, v. 18, n. 11, p. 853–862, 2001.

GHOSH, D. et al. 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**, v. 86, p. 678–686, 2006.

GHUMATKAR, P. J. et al. Nootropic, neuroprotective and neurotrophic effects of phloretin in scopolamine induced amnesia in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 135, n. 2–3, p. 182–191, 4 ago. 2015.

GIMÉNEZ-LLORT, L. et al. Working memory deficits in transgenic rats overexpressing human adenosine A2A receptors in the brain. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 87, n. 1, p. 42–56, jan. 2007.

GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M. G. A Century of Alzheimer's Disease. **Science**, v. 314,



n. 5800, p. 777–781, 3 nov. 2006.

GOLD, M.; EL KHOURY, J.  $\beta$ -amyloid, microglia, and the inflammasome in Alzheimer's disease. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 6, p. 607–611, 7 nov. 2015.

GOLDBERG, E. L.; DIXIT, V. D. Drivers of age-related inflammation and strategies for healthspan extension. **Immunological Reviews**, v. 265, n. 1, p. 63–74, maio 2015.

GOLDSMITH, D. R.; SCOTT, L. J. Donepezil. **Drugs & Aging**, v. 20, n. 15, p. 1127–1136, 2003.

GOPALAN, A. et al. The health benefits of blackcurrants. **Food Funct**, v. 3, n. 8, p. 795–809, 2012.

GREIG, N. H.; LAHIRI, D. K.; SAMBAMURTI, K. Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. **International psychogeriatrics**, v. 14 Suppl 1, p. 77–91, 2002a.

GREIG, N. H.; LAHIRI, D. K.; SAMBAMURTI, K. Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. **International psychogeriatrics**, v. 14 Suppl 1, p. 77–91, 2002b.

GROLEAU, M. et al. Distribution and effects of the muscarinic receptor subtypes in the primary visual cortex. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 7, 19 jun. 2015.

GUO, C. et al. Neuroprotective effects of polygalacic acid on scopolamine-induced memory deficits in mice. **Phytomedicine**, v. 23, n. 2, p. 149–155, 2016.

GUPTA, S. et al. Discovery of dual binding site acetylcholinesterase inhibitors identified by pharmacophore modeling and sequential virtual screening techniques. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 4, p. 1105–1112, fev. 2011.

GUSTAW-ROTHENBERG, K.; KOWALCZUK, K.; STRYJECKA-ZIMMER, M. Lipids' peroxidation markers in Alzheimer's disease and vascular dementia. **Geriatrics and Gerontology International**, v. 10, n. 2, p. 161–166, 2010.

GUTIERRES, J. M. et al. 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.

GUTIERRES, J. M. et al. 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, 2014a.

GUTIERRES, J. M. et al. Neuroprotective effect of anthocyanins on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia in rats. **Int J Dev Neurosci**, v. 33, p. 88–97, 2014b.

HAIDER, S.; TABASSUM, S.; PERVEEN, T. Scopolamine-induced greater alterations in neurochemical profile and increased oxidative stress demonstrated a better model of

dementia: A comparative study. **Brain Research Bulletin**, v. 127, p. 234–247, 2016.

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

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants - Quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125–130, 2011.

HAM, J.; EVANS, B. A. J. An emerging role for adenosine and its receptors in bone homeostasis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 3, n. 113, 2012.

HASSIMOTTO, N. M. A. **Atividade antioxidante de alimentos vegetais. Estrutura e estudo de biodisponibilidade de antocianinas de amora silvestre (Morus sp.)**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 11 ago. 2005.

HAWLEY, W. R. et al. Choline acetyltransferase in the hippocampus is associated with learning strategy preference in adult male rats. **Behavioural Brain Research**, v. 289, p. 118–124, ago. 2015.

HELENE, A. F.; XAVIER, G. F. Working memory and acquisition of implicit knowledge by imagery training, without actual task performance. **Neuroscience**, v. 139, n. 1, p. 401–413, 2006.

HEPPNER, F. L.; RANSOHOFF, R. M.; BECHER, B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 358–372, 20 jun. 2015.

HONG, S. M. et al. Cognitive Improving Effects by Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Vinegar on Scopolamine-Induced Amnesia Mice Model. **J Agric Food Chem**, v. 66, n. 1, p. 99–107, 2018.

HOUGHTON, P. J.; REN, Y.; HOWES, M.-J. Acetylcholinesterase Inhibitors from Plants and Fungi. **ChemInform**, v. 37, n. 32, 8 ago. 2006.

HOUSE, R. E. The Use of Scopolamine in Criminology. **The American Journal of Police Science**, v. 2, n. 4, p. 328, jul. 1931.

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

HUMMER, K. E.; DALE, A. Horticulture of Ribes. **Forest Pathology**, v. 40, n. 3–4, p. 251–263, 16 ago. 2010.

IIDA, H. et al. Effect of Black-Currant Extract on Negative Lens-Induced Ocular Growth in Chicks. **Ophthalmic Research**, v. 44, n. 4, p. 242–250, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Projeção da população do Brasil e das Unidades da Federação**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>>. Acesso em: 20 jun. 2019.

IZQUIERDO, I. et al. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, v. 103, n. 1, p. 1–11, 1999.

IZQUIERDO, I. A. **Memória**. 2<sup>a</sup> ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

IZQUIERDO, I. A. et al. Memória: tipos e mecanismos – achados recentes. **Revista USP**, n. 98, p. 9, 28 ago. 2013.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 68, n. 3, p. 285–316, nov. 1997.

J. THOPPIL, R. et al. Black Currant Anthocyanins Abrogate Oxidative Stress through Nrf2-Mediated Antioxidant Mechanisms in a Rat Model of Hepatocellular Carcinoma. **Current Cancer Drug Targets**, v. 12, n. 9, p. 1244–1257, 1 nov. 2012.

JACK, C. R. et al. Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 7, n. 3, p. 257–262, maio 2011.

JACKSON, S.; HAM, R. J.; WILKINSON, D. The safety and tolerability of donepezil in patients with Alzheimer's disease. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 58, n. s1, p. 1–8, nov. 2004.

JIA, N. et al. Antioxidant activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract and its inhibitory effect on lipid and protein oxidation of pork patties during chilled storage. **Meat Sci**, v. 91, n. 4, p. 533–539, 2012a.

JIA, N. et al. Radical scavenging activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract and its inhibitory effect on gastric cancer cell proliferation via induction of apoptosis. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 1, p. 382–390, jan. 2012b.

JONES, C. K.; BYUN, N.; BUBSER, M. Muscarinic and Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists and Allosteric Modulators for the Treatment of Schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 1, p. 16–42, 28 jan. 2012.

JOSEPH, J. A.; FISHER, D. R.; CAREY, A. N. Fruit extracts antagonize A $\beta$ - or DA-induced deficits in Ca<sup>2+</sup> flux in M1-transfected COS-7 cells. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 6, n. 4, p. 403–411, 24 ago. 2004.

JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 3, p. 201–212, 18 mar. 2011.

KADDURAH-DAOUK, R. et al. Alterations in metabolic pathways and networks in Alzheimer's disease. **Translational Psychiatry**, v. 3, n. 4, p. e244–e244, 9 abr. 2013.

KARJALAINEN, R. et al. A REVIEW ON BIOACTIVE COMPOUNDS IN BLACK CURRANTS (*RIBES NIGRUM* L.) AND THEIR POTENTIAL HEALTH-PROMOTING PROPERTIES. **Acta Horticulturae**, n. 839, p. 301–307, jul. 2009.

KHAKH, B. S.; ALAN NORTH, R. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. **Nature**, v. 442, n. 7102, p. 527–532, ago. 2006.

KLINKENBERG, I.; BLOKLAND, A. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 34, n. 8, p. 1307–1350, 2010a.

KLINKENBERG, I.; BLOKLAND, A. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: A review of animal behavioral studies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 8, p. 1307–1350, jul. 2010b.

KNOPMAN, D. S. et al. Practice parameter: Diagnosis of dementia (an evidence-based review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology**, v. 56, n. 9, p. 1143–1153, 8 maio 2001.

KOLES, L.; FURST, S.; ILLES, P. Purine Ionotropic (P2X) Receptors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 23, p. 2368–2384, 1 ago. 2007.

KOWALTOWSKI, A. J. et al. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 333–343, ago. 2009.

KRYGER, G.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept®): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. **Structure**, v. 7, n. 3, p. 297–307, mar. 1999.

KUKULSKI, F.; LÉVESQUE, S. A.; SÉVIGNY, J. Impact of Ectoenzymes on P2 and P1 Receptor Signaling. **Advances in Pharmacology**, v. 61, p. 263–299, 2011.

KUMAR, A. et al. Current knowledge and pharmacological profile of berberine: An update. **European Journal of Pharmacology**, v. 761, p. 288–297, ago. 2015.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and Functions of Inflammasomes. **Cell**, v. 157, n. 5, p. 1013–1022, maio 2014.

LANCTÔT, K. L. et al. Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease: a meta-analysis. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 169, n. 6, p. 557–64, 16 set. 2003.

LANGER, D. et al. Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. **Cell and Tissue Research**, v. 334, n. 2, p. 199–217, 9 nov. 2008.

LEE, J. S. et al. Ethanol extract of Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix, Myelophil, exerts anti-amnesic effect in a mouse model of scopolamine-induced memory deficits. **J Ethnopharmacol**, v. 153, n. 3, p. 782–792, 2014.

LI, J. et al. Benzoate fraction from *Gentiana rigescens* Franch alleviates scopolamine-induced impaired memory in mice model in vivo. **J Ethnopharmacol**, v. 193, p. 107–116, 2016.

LINDNER, M. D. et al. Donepezil primarily attenuates scopolamine-induced deficits in psychomotor function, with moderate effects on simple conditioning and attention, and small

effects on working memory and spatial mapping. **Psychopharmacology**, v. 188, n. 4, p. 629–640, 6 out. 2006.

LISTER, M. F. et al. The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation. **Journal of Inflammation**, v. 4, n. 1, p. 5, 2007.

LOPES, T. J. et al. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira Agrocência**, v. 13, p. 291–297, 2007.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr**, v. 79, n. 5, p. 727–747, 2004.

MARIATHASAN, S.; MONACK, D. M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 1, p. 31–40, jan. 2007.

MARISCO, P. C. et al. Piracetam Prevents Scopolamine-Induced Memory Impairment and Decrease of NTPDase, 5'-Nucleotidase and Adenosine Deaminase Activities. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 8, p. 1704–1714, 16 ago. 2013.

MARTINEZ, S. T.; ALMEIDA, M. R.; PINTO, A. C. Alucinógenos naturais: um voo da Europa Medieval ao Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2501–2507, 2009.

MARTINI, F. et al. Ebselel inhibits the activity of acetylcholinesterase globular isoform G4 in vitro and attenuates scopolamine-induced amnesia in mice. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 7, p. 5598–5608, jul. 2018.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The Inflammasomes: Guardians of the Body. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 229–265, abr. 2009.

MASSON, P. A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 998, n. 3, p. 258–266, out. 1989.

MATSUMOTO, H. et al. Orally Administered Delphinidin 3-Rutinoside and Cyanidin 3-Rutinoside Are Directly Absorbed in Rats and Humans and Appear in the Blood as the Intact Forms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1546–1551, mar. 2001.

MATSUMOTO, H. et al. Effects of blackcurrant anthocyanin intake on peripheral muscle circulation during typing work in humans. **European Journal of Applied Physiology**, v. 94, n. 1–2, p. 36–45, 17 maio 2005.

MCGAUGH, J. L. Memory--a Century of Consolidation. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 248–251, 14 jan. 2000.

MCGAUGH, J. L.; IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, n. 6, p. 208–210, jun. 2000.

MCGHIE, T. K. et al. Anthocyanin Glycosides from Berry Fruit Are Absorbed and Excreted

Unmetabolized by Both Humans and Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4539–4548, jul. 2003.

MCQUISTON, A. R. Acetylcholine release and inhibitory interneuron activity in hippocampal CA1. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 6, 16 set. 2014.

MEDINA DOS SANTOS, N. et al. Current evidence on cognitive improvement and neuroprotection promoted by anthocyanins. **Current Opinion in Food Science**, v. 26, p. 71–78, abr. 2019.

MESULAM, M.-M. et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110, n. 4, p. 627–39, 2002.

MILLAR, N. S.; GOTTI, C. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. **Neuropharmacology**, v. 56, n. 1, p. 237–246, jan. 2009.

MIURA, T. et al. Metal Binding Modes of Alzheimer's Amyloid  $\beta$ -Peptide in Insoluble Aggregates and Soluble Complexes †. **Biochemistry**, v. 39, n. 23, p. 7024–7031, jun. 2000.

NACHUM, Z.; SHUPAK, A.; GORDON, C. R. Transdermal Scopolamine for Prevention of Motion Sickness. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 45, n. 6, p. 543–566, 2006.

NADEL, L. et al. Memory formation, consolidation and transformation. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 7, p. 1640–1645, ago. 2012.

NADER, K.; HARDT, O. A single standard for memory: the case for reconsolidation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 224–234, mar. 2009.

NICOLET, Y. et al. Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 42, p. 41141–41147, 17 out. 2003.

NIELSEN, I. L. F. et al. Quantification of anthocyanins in commercial black currant juices by simple high-performance liquid chromatography. Investigation of their pH stability and antioxidative potency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5861–5866, 2003.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418–425, 1 out. 2001.

NOUR, V.; TRANDAFIR, I.; IONICA, M. E. Ascorbic acid, anthocyanins, organic acids and mineral content of some black and red currant cultivars. **Fruits**, v. 66, n. 5, p. 353–362, 22 set. 2011.

NUNOMURA, A. et al. Involvement of Oxidative Stress in Alzheimer Disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 65, n. 7, p. 631–641, jul. 2006.

ODUBANJO, V. O. et al. Aqueous extracts of two tropical ethnobotanicals (Tetrapleura

tetraptera and *Quassia undulata*) improved spatial and non-spatial working memories in scopolamine-induced amnesic rats: Influence of neuronal cholinergic and antioxidant systems. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 99, p. 198–204, mar. 2018.

OPREA, E. et al. Chemical and biological studies of *Ribes nigrum* L. buds essential oil. **Biofactors**, v. 34, n. 1, p. 3–12, 2008.

OTAEGUI-ARRAZOLA, A. et al. Diet, cognition, and Alzheimer's disease: food for thought. **European Journal of Nutrition**, v. 53, n. 1, p. 1–23, 27 fev. 2014.

PACHECO, S. M. et al. Anthocyanins as a potential pharmacological agent to manage memory deficit, oxidative stress and alterations in ion pump activity induced by experimental sporadic dementia of Alzheimer's type. **J Nutr Biochem**, v. 56, p. 193–204, 2018.

PAGNUSSAT, N. et al. Adenosine A<sub>2</sub>A receptors are necessary and sufficient to trigger memory impairment in adult mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 15, p. 3831–3845, ago. 2015.

PAN, L. et al. Design, synthesis and evaluation of isaindigotone derivatives as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 13, p. 3790–3793, jul. 2008.

PAPADOPOULOS, M. . et al. Increasing vulnerability of astrocytes to oxidative injury with age despite constant antioxidant defenses. **Neuroscience**, v. 82, n. 3, p. 915–925, out. 1997.

PARFITT, G. M. et al. Participation of hippocampal cholinergic system in memory persistence for inhibitory avoidance in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 97, n. 2, p. 183–188, 2012.

PARK, H. R. et al. Fermented *Sipjeondaebo-tang* Alleviates Memory Deficits and Loss of Hippocampal Neurogenesis in Scopolamine-induced Amnesia in Mice. **Sci Rep**, v. 6, p. 22405, 2016.

PENNINCKX, M. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 9–10, p. 737–742, jun. 2000.

PEPEU, G.; GIOVANNINI, M. G. Cholinesterase inhibitors and memory. **Chemico-Biological Interactions**, v. 187, n. 1–3, p. 403–408, set. 2010.

PERRY, G. et al. Alzheimer Disease and the Role of Free Radicals in the Pathogenesis of the Disease. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 7, n. 1, p. 3–10, 1 fev. 2008.

PERSSON, T.; POPESCU, B. O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Why Did Antioxidant Therapy Fail? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

POLACHINI, C. R. N. et al. Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis. **Neuroscience**, v. 266, p. 266–274, 2014.

- PONTES, A. H.; DE SOUSA, M. V. Mass Spectrometry-Based Approaches to Understand the Molecular Basis of Memory. **Frontiers in Chemistry**, v. 4, n. October, p. 1–12, 2016.
- PRINCE, M. et al. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. **Alzheimer's & Dementia**, v. 9, p. 65–75, 2013.
- PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 513–523, jun. 2011.
- QIU, Y. et al. Neuroprotective effects of HTR1A antagonist WAY-100635 on scopolamine-induced delirium in rats and underlying molecular mechanisms. **BMC Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 66, 19 dez. 2016.
- QUIDEAU, S. et al. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 3, p. 586–621, 17 jan. 2011.
- QUILLFELDT, J. A. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. In: **Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research**. Cham: Springer International Publishing, p. 271–311, 2016.
- RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 7<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- RAHMAN, A. The Role of Adenosine in Alzheimers Disease. **Current Neuropharmacology**, v. 7, n. 3, p. 207–216, 2009.
- REBOLA, N. et al. Adenosine A2A receptors control neuroinflammation and consequent hippocampal neuronal dysfunction. **Journal of Neurochemistry**, v. 117, n. 1, p. 100–111, abr. 2011.
- REHMAN, S. U. et al. Anthocyanins Reversed D-Galactose-Induced Oxidative Stress and Neuroinflammation Mediated Cognitive Impairment in Adult Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 1, p. 255–271, 6 jan. 2017.
- REICHERT, K. P. et al. Lingonberry Extract Provides Neuroprotection by Regulating the Purinergic System and Reducing Oxidative Stress in Diabetic Rats. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 62, n. 16, p. 1800050, ago. 2018.
- REITZ, C.; MAYEUX, R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. **Biochemical Pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 640–651, abr. 2014.
- RELKIN, N. R. et al. A Large, Community-Based, Open-Label Trial of Donepezil in the Treatment of Alzheimer's Disease. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 16, n. 1, p. 15–24, 2003.
- RENDEIRO, C. et al. Flavonoids as modulators of memory and learning: molecular interactions resulting in behavioural effects. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 2, p. 246–262, 14 maio 2012.
- RENNER, U. D.; OERTEL, R.; KIRCH, W. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in



Clinical Use of Scopolamine. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 27, n. 5, p. 655–665, out. 2005.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409–430, 30 jun. 2006.

RODRIGUES, M. V. et al. Protection of cholinergic and antioxidant system contributes to the effect of Vitamin D 3 ameliorating memory dysfunction in sporadic dementia of Alzheimer's type. **Redox Report**, v. 24, n. 1, p. 34–40, 17 jan. 2019.

ROJO, L. E. et al. Neuroinflammation: Implications for the Pathogenesis and Molecular Diagnosis of Alzheimer's Disease. **Archives of Medical Research**, v. 39, n. 1, p. 1–16, jan. 2008.

ROSENBAUM, R. S. et al. Remote spatial memory in aging: all is not lost. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 4, n. 25, 2012.

SÁIZ, J. et al. Rapid determination of scopolamine in evidence of recreational and predatory use. **Science & Justice**, v. 53, n. 4, p. 409–414, dez. 2013.

SANDERSON, D. J.; BANNERMAN, D. M. The role of habituation in hippocampus-dependent spatial working memory tasks: Evidence from GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice. **Hippocampus**, v. 22, n. 5, p. 981–994, maio 2012.

SAXENA, A. et al. Differences in active-site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. **Chemico-Biological Interactions**, v. 119–120, p. 61–69, maio 1999.

SAXENA, A. et al. Aromatic amino-acid residues at the active and peripheral anionic sites control the binding of E2020 (Aricept) to cholinesterases. **European journal of biochemistry**, v. 270, n. 22, p. 4447–58, nov. 2003.

SHETH, S. et al. Adenosine Receptors: Expression, Function and Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 2, p. 2024–2052, 28 jan. 2014.

SHIEH, C.-H. et al. P2X7-dependent, but differentially regulated release of IL-6, CCL2, and TNF- $\alpha$  in cultured mouse microglia. **Glia**, v. 62, n. 4, p. 592–607, abr. 2014.

SHIH, P. H. et al. 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.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, n. 3, p. 293–302, jun. 2005.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: How is structure related to function? **Chemico-Biological Interactions**, v. 175, n. 1–3, p. 3–10, set. 2008.

SILVA, T. et al. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: from

natural products to drug prototypes. **Ageing Res Rev**, v. 15, p. 116–145, 2014.

SINGH, M. et al. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 70, p. 165–188, dez. 2013.

SINHA, M. et al. Antioxidant role of amyloid  $\beta$  protein in cell-free and biological systems: implication for the pathogenesis of Alzheimer disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 56, p. 184–192, mar. 2013.

SOARES, J. C.; FORNARI, R. V; OLIVEIRA, M. G. Role of muscarinic M1 receptors in inhibitory avoidance and contextual fear conditioning. **Neurobiol Learn Mem**, v. 86, n. 2, p. 188–196, 2006.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 294–302, abr. 2001.

SPERLÁGH, B.; ILLES, P. P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 10, p. 537–547, out. 2014.

SPERLING, R. A. et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 7, n. 3, p. 280–292, maio 2011.

SQUIRE, L. R.; DEDE, A. J. O. Conscious and Unconscious Memory Systems. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 3, p. a021667, 2 mar. 2015.

SQUIRE, L. R.; STARK, C. E. L.; CLARK, R. E. THE MEDIAL TEMPORAL LOBE. **Annual Review of Neuroscience**, v. 27, n. 1, p. 279–306, 21 jul. 2004.

SUGIMOTO, H. et al. Research and Development of Donepezil Hydrochloride, a New Type of Acetylcholinesterase Inhibitor. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 89, n. 1, p. 7–20, 2002.

TAKAHASHI, R. N.; PAMPLONA, F. A.; PREDIGER, R. D. S. Adenosine receptor antagonists for cognitive dysfunction: a review of animal studies. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, p. 2614–32, 1 jan. 2008.

TALAVÉRA, S. et al. Anthocyanin Metabolism in Rats and Their Distribution to Digestive Area, Kidney, and Brain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 3902–3908, maio 2005.

TISEO; PERDOMO; FRIEDHOFF. Metabolism and elimination of <sup>14</sup>C-donepezil in healthy volunteers: a single-dose study. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 46, n. S1, p. 19–24, 4 jan. 2002.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, n. 3–4, p. 145–155, maio 2003.

TUNG, B. T.; HAI, N. T.; THU, D. K. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory

activities in vitro of different fraction of *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis extract and attenuation of scopolamine-induced cognitive impairment in mice. **J Ethnopharmacol**, v. 198, p. 24–32, 2017.

UBHI, K.; MASLIAH, E. Alzheimer's disease: recent advances and future perspectives. **J Alzheimers Dis**, v. 33 Suppl 1, p. S185-94, 2013.

UMUKORO, S. et al. Free radical scavenging effect of donepezil as the possible contribution to its memory enhancing activity in mice. **Drug Research**, 2014.

UNITED NATIONS. **Ageing**. Disponível em: <<https://www.un.org/en/sections/issues-depth/ageing/index.html>>. Acesso em: 20 jun. 2019.

VAGIRI, M. et al. Phenols and Ascorbic Acid in Black Currants (*Ribes nigrum* L.): Variation Due to Genotype, Location, and Year. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 39, p. 9298–9306, 2 out. 2013.

VAGIRI, M. et al. Phenolic compounds in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves relative to leaf position and harvest date. **Food Chemistry**, v. 172, p. 135–142, abr. 2015.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, jan. 2007.

VEPSÄLÄINEN, S. et al. 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. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 360–370, jan. 2013.

VOLPICELLI, L. A.; LEVEY, A. I. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. **Progress in Brain Research**, v. 145, p. 59–66, 2004.

VOS, S. J. et al. Preclinical Alzheimer's disease and its outcome: a longitudinal cohort study. **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 10, p. 957–965, out. 2013.

WEI, P. et al. The Potential Role of the NLRP3 Inflammasome Activation as a Link Between Mitochondria ROS Generation and Neuroinflammation in Postoperative Cognitive Dysfunction. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 2019.

WEINER, M. W. et al. The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: A review of papers published since its inception. **Alzheimer's & Dementia**, v. 9, n. 5, p. e111–e194, set. 2013.

WEINTRAUB, S.; WICKLUND, A. H.; SALMON, D. P. The Neuropsychological Profile of Alzheimer Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 4, p. a006171–a006171, 1 abr. 2012.

WEISMAN, G. A. et al. P2Y Receptors in the Mammalian Nervous System: Pharmacology, Ligands and Therapeutic Potential. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 11, n. 6, p. 722–738, 1 out. 2012.

WHITTAKER, V. P. How the cholinesterases got their modern names. **Chemico-Biological Interactions**, v. 187, n. 1–3, p. 23–26, set. 2010.

WOODS, L. T. et al. Purinergic receptors as potential therapeutic targets in Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, v. 104, p. 169–179, maio 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dementia**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>>. Acesso em: 20 jun. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World report on ageing and health**. Disponível em: <[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/186463/9789240694811\\_eng.pdf;jsessionid=7F27BF3D5E6DEBFDC72E97F95C7EC333?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/186463/9789240694811_eng.pdf;jsessionid=7F27BF3D5E6DEBFDC72E97F95C7EC333?sequence=1)>. Acesso em: 25 jun. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The top 10 causes of death**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Acesso em: 26 jun. 2019.

WORTMANN, M. Dementia: a global health priority - highlights from an ADI and World Health Organization report. **Alzheimers Res Ther**, v. 4, n. 5, p. 40, 2012.

WU, X. et al. Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and Estimation of Normal Consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 4069–4075, maio 2006.

XIE, H. Q. et al. Regulation of a Transcript Encoding the Proline-rich Membrane Anchor of Globular Muscle Acetylcholinesterase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 16, p. 11765–11775, 20 abr. 2007.

XU, Q.-Q. et al. Sodium Tanshinone IIA Sulfonate Attenuates Scopolamine-Induced Cognitive Dysfunctions via Improving Cholinergic System. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

YARON, J. R. et al. K<sup>+</sup> regulates Ca<sup>2+</sup> to drive inflammasome signaling: dynamic visualization of ion flux in live cells. **Cell Death & Disease**, v. 6, n. 10, p. e1954–e1954, 29 out. 2015.

YE, C. Y. et al. Donepezil attenuates A $\beta$ -associated mitochondrial dysfunction and reduces mitochondrial A $\beta$  accumulation in vivo and in vitro. **Neuropharmacology**, v. 95, p. 29–36, ago. 2015.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 5, p. 673–694, maio 2008.

YONEI, Y. et al. Evaluation of effects of cassis (*Ribes nigrum* L.) juice on human vascular function and gene expression using a microarray system. **ANTI-AGING MEDICINE**, v. 6, n. 5, p. 22–31, 2009.

YOSHIYAMA, Y. et al. Anti-Inflammatory Action of Donepezil Ameliorates Tau Pathology, Synaptic Loss, and Neurodegeneration in a Tauopathy Mouse Model. **Journal of**

**Alzheimer's Disease**, v. 22, n. 1, p. 295–306, 28 set. 2010.

YOU DIM, K. A.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A. Flavonoids and the brain: interactions at the blood–brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 11, p. 1683–1693, dez. 2004.

ZHOU, X. et al. Design, synthesis, and acetylcholinesterase inhibitory activity of novel coumarin analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 17, p. 8011–8021, set. 2008.

ZHU, X. et al. Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. **Cell Mol Life Sci**, v. 64, n. 17, p. 2202–2210, 2007.

ZIMMERMANN, H. Purinergic signaling in neural development. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 22, n. 2, p. 194–204, abr. 2011.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 3, p. 437–502, 4 set. 2012.

## ANEXO A



*Improving food & health*

## NutriPhy® Blackcurrant 100

### Product Information

Version: 2 PI GLOB EN 07-15-2015

#### Description

NutriPhy® Blackcurrant 100 is a spray-dried, free flowing extract of carefully selected blackcurrant berries (*Ribes nigrum*).

<b>Material No:</b>	686831	<b>Storage temp:</b>	10 - 30 °C / 50 - 86 °F
<b>Size</b>	15 kg	<b>Conditions:</b>	Dry
<b>Type</b>	Bag(s) in box	<b>Shelf Life</b>	1095 days in unopened containers at the recommended storage temperature

#### Ingredients

Blackcurrant fruits (*Ribes nigrum*), Maltodextrin.

#### Active Molecules

Anthocyanins (% on DM)	30% ± 3 HPLC internal method, results expressed in Cyanidin 3-glucoside.
Anthocyanins (% on pwd)	25% ± 2 UV-Vis internal spectrophotometric method (pH differential method), results expressed in Cyanidin 3-glucoside.
Anthocyanins (% on pwd)	Min. 35% Expressed as delphinidin 3-rutinoside equivalent with UV-spectrophotometric method.
Indicative ORAC Value	4000 TE/gr of powder ( <i>Fluorescein method</i> )

#### Suggested Applications

Functional foods, Dietary supplements.

#### Origin

Europe.

#### Extract type

Process	Aqueous extraction.
Indicative plant/extract ratio	Min. 800:1 - Max. 1500:1

#### Physical Properties

Color:	Dark purple	Solubility:	Water soluble
Form:	Powder	Odor/Taste:	No characteristic odor

#### Specification

Dry matter (110°C, 2 hours):	Min. 92%	Bulk density (untapped):	0.30-0.40 g/ml
Moisture (110°C, 2 hours):	Max. 8%	Bulk density (tapped):	0.40-0.50 g/ml
Particle size (sieves):	90% thru 300 $\mu$ m (50 mesh)	pH:	2.80 - 3.50
SO <sub>2</sub> (ppm):	< 250 ppm		(Monnier-Williams)

#### Microbiological quality

Total Viable Count:	≤ 1000 cfu/g	<b>Pathogens</b>	
Total Yeasts and Moulds:	≤ 100 cfu/g	<i>Salmonella sp.:</i>	Absent in 25g
Total Enterobacteriaceae:	≤ 10 cfu/g	<i>E. coli:</i>	Absent in 1 g
		<i>S. aureus:</i>	Absent in 1 g

#### Contaminants

Lead	Max. 3.0 ppm	Cadmium	Max. 1.0 ppm
Arsenic*	Max. 5.0 ppm	Mercury	Max. 0.1 ppm
Heavy metal total (US only)	Max. 10 ppm (USP)		

[www.chr-hansen.com](http://www.chr-hansen.com)

The information contained herein is to the best of our knowledge and belief, true and accurate and the product(s) mentioned herein do(es) not infringe the intellectual property rights of any third party. The product(s) may be covered by pending or issued patents, registered or unregistered trademarks, or similar intellectual property rights. Copyright © Chr. Hansen A/S. All rights reserved.

## ANEXO B



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DAS ANTOCIANINAS DO BLACKCURRANT EM MODELO DE AMNÉSIA INDUZIDA POR ESCOPOLAMINA EM CAMUNDONGOS", protocolada sob o CEUA nº 8343230616, sob a responsabilidade de **Vera Maria Melchior Morsch e equipe; Pauline da Costa; Fabiano Carvalho Barbosa; Jessié Martins Gutierrez; Karine Paula Reichert; Letícia Toneto Druzian; Mariana Sauzen Alves** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 25/08/2016.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF BLACKCURRANT ANTHOCYANINS IN SCOPOLAMINE-INDUCED AMNESIA IN MICE.", utilizing 160 Heterogenics mice (160 males), protocol number CEUA 8343230616, under the responsibility of **Vera Maria Melchior Morsch and team; Pauline da Costa; Fabiano Carvalho Barbosa; Jessié Martins Gutierrez; Karine Paula Reichert; Letícia Toneto Druzian; Mariana Sauzen Alves** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 08/25/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**Vigência da Proposta: de **08/2016** a **09/2017**Área: **Bioquímica E Biologia Molecular**Origem: **Biotério Central UFSM**Espécie: **Camundongos heterogênicos**sexo: **Machos**idade: **5 a 7 semanas**N: **160**Linhagem: **Swis**Peso: **20 a 30 g**

Resumo: Dentre as doenças crônicas degenerativas a Doença de Alzheimer (DA), vem sendo considerada um problema para a saúde pública, uma vez que acomete um grande número de pessoas em idade avançada. A DA é uma disfunção neurodegenerativa progressiva multifatorial, caracterizada pelo acúmulo de peptídeo  $\beta$ -amilóide, emaranhados neurofibrilares, neuroinflamação e disfunção colinérgica, provocando uma deterioração da memória e de outras funções cognitivas. Além de alterações no sistema colinérgico, principal sistema envolvido na DA, o qual regula fatores neurogênicos, também há uma correlação da DA com o sistema purinérgico e o estresse oxidativo. Assim, como ainda não há uma cura para DA e as terapias atuais são apenas paliativas, torna-se importante a busca de compostos que previnam os danos cognitivos causados por esta doença. Neste contexto, sabe-se que as antocianinas, um grupo de compostos polifenólicos naturais, exerce diversas funções terapêuticas destacando o potencial antioxidante e neuroprotetor, demonstrando que podem ter efeitos benéficos sobre a memória. Portanto, o objetivo deste projeto de pesquisa é avaliar o possível efeito neuroprotetor da antocianinas provenientes do Blackcurrant sobre os efeitos neurodegenerativos causados pelo tratamento com escopolamina em camundongos. Para isso, os animais serão divididos em sete grupos (n=91): controle/veículo, Escopolamina 1 mg/kg, Blackcurrant 100 mg/kg, Escopolamina/Blackcurrant 50 mg/Kg, Escopolamina/Blackcurrant 100 mg/Kg, Escopolamina/Donepezila 5 mg/kg, Escopolamina/Donepezila/Blackcurrant 100 mg/Kg tratados durante 35 dias. Serão analisados os parâmetros comportamentais, os níveis dos fatores neurogênicos, a proliferação e a sobrevivência celular usando 57-Bromo-2'-desoxiuridina, (BrdU), além da atividade e expressão das enzimas acetilcolinesterase, NTPDase e 5' nucleotidase, bem como avaliação dos níveis da acetilcolina e dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, também será analisado parâmetros de estresse oxidativo. Todas as técnicas serão realizadas em hipocampo, córtex cerebral e sinaptossomas. Espera-se assim entender os mecanismos pelos quais as antocianinas são capazes de reverter ou amenizar os efeitos danosos.

Local do experimento: Os animais serão mantidos no biotério setorial da bioquímica, prédio 19, em um ambiente com temperatura controlada ( $23^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) e com um ciclo de 12 horas claro/escuro, o ambiente possui 2 exaustores de ar para uma completa renovação do ar interno do biotério. A ração que os animais recebem tem balanceamento de nutrientes essenciais, proteínas, carboidratos e lipídeos, componentes básicos e iguais aos utilizados no biotério central, sendo a água e a ração sólida fornecidas ad libitum. Antes do início do experimento, os animais passarão por um período de adaptação de 10 dias e o fundo das caixas receberão maravalha, que após o uso, será descartada como contaminante. Além disso, os animais serão distribuídos em 10 camundongos por caixa (protocolo I) e 5 camundongos por caixa (protocolo II), durante todo o período dos tratamentos, e todas as caixas receberão objetos (rolos de papel e/ou PVC) para enriquecimento ambiental.

Avenida Itália, 1000, Reitoria, 2º andar - CEP 97105-900 Santa Maria, RS - tel: 55 (51) 3220-9362 / fax:  
Horário de atendimento: das 8:30 às 12h e 14h às 17hs - e-mail: ceua.ufsm@gmail.com  
CEUA N 8343230616

Santa Maria, 26 de agosto de 2016

Prof. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Brock Rosemberg  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria