UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Gabrielle Nunes Da Silva

Avaliação dos efeitos neuroprotetores do extrato seco da Unha de Gato (*Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*) sobre a memória, perda de neurônios e reatividade glial no hipocampo de ratos após neuroinflamação crônica recorrente

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Porto Alegre

2023

Gabrielle Nunes da Silva

Avaliação dos efeitos neuroprotetores do extrato seco da Unha de Gato (*Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*) sobre a memória, perda de neurônios e reatividade glial no hipocampo de ratos após neuroinflamação crônica recorrente

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof[a.] Dra. Marilda da Cruz Fernandes

Coorientador: Dr. Jessié Martins Gutierres

Porto Alegre

2023

Catalogação na Publicação

Nunes da Silva, Gabrielle
Avaliação dos efeitos neuroprotetores do extrato seco da Unha de Gato (Uncaria tomentosa e Uncaria guianensis) sobre a memória, perda de neurônios e reatividade glial no hipocampo de ratos após neuroinflamação crônica recorrente / Gabrielle Nunes da Silva. -- 2023.
88 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2023.

Orientador(a): Marilda da Cruz Fernandes ; coorientador(a): Jessié Martins Gutierres.

1. Neuroinflamação. 2. Lipopolissacarídeo. 3. Uncaria. 4. Hipocampo. 5. Memória. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profª. Drª. Marilda da Cruz Fernandes, por ter me escolhido como sua orientanda. Nossas conversas e troca de experiências foram fundamentais para a minha jornada.

Ao meu coorientador, Dr. Jessié Martins Gutierres, expresso a minha gratidão por ter acreditado em mim e por me incentivar quando eu achava que nada ia dar certo.

À minha amiga, Fernanda Huf, você foi meu apoio dentro e fora do laboratório. Nunca serei capaz de descrever o quanto você foi importante nesta jornada.

À minha amiga, Adriana Zago, por me ajudar nos momentos de dúvidas e pelas mateadas entre uma imuno e outra. Conversar com você é garantia de alegria.

Aos amigos e colegas do nosso grupo, Anemarí Girardon, Fabiano Barbosa Carvalho, Luiz Felipe Koenig, Renan Franke Montenegro Torres, pelos momentos de descontração e pelo apoio valioso durante os experimentos.

Aos alunos de iniciação científica, agradeço sinceramente pela dedicação em contribuir para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos técnicos do Laboratório de Pesquisa em Patologia da UFCSPA, Giuliano Rizzotto Guimarães e Teresinha Stein, agradeço pela dedicação em compartilhar seus conhecimentos e pelo companheirismo ao longo destes anos.

À minha família, Renato e Laura, meu porto seguro e garantia de apoio nos momentos bons e ruins. Amo vocês!

À Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e à CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS....4
LISTA DE FIGURAS....8
RESUMO....9
ABSTRACT....11
1 REFERENCIAL TEÓRICO....1
1.1 Células da glia....1
1.2 Astrócitos e a sua função no sistema nervoso central....4
1.2.1 Reatividade astrocitária....7
1.3 Hipocampo....8
1.4 Doenças neurodegenerativas e neuroinflamação....12
1.4.1 Lipopolissacarídeo....16
1.5 Avaliação do comportamento e de déficits de memória em roedores....17
1.5.1 Teste do campo aberto....18
1.5.2 Reconhecimento de objetos....19
1.5.3 Labirinto em Y....20
1.6 Fitoterápicos e saúde pública....20
1.7 Uncaria....22
2 REFERÊNCIAS....28
3 OBJETIVOS....39
3.1 Objetivo geral....39
3.2 Objetivos específicos....39
4 ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS....40
5 CONCLUSÕES....71
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS....72
7 Anexo....73
7.1 Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA....73

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
AChE	Acetilcolinesterase
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIF-1	Fator inflamatório aloenxerto-1
APP	Proteína precursora de amiloide
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE	Barreira hematoencefálica
CA	Corno de Ammon
CA1	Região 1 do Corno de Ammon
CA2	Região 2 do Corno de Ammon
CA3	Região 3 do Corno de Ammon
CA4	Região 4 do Corno de Ammon
CCG	Camada de células granulares
CE	Córtex entorrinal
CG	Células granulares
CM	Camada molecular
CPAT	Célula progenitora amplificadora transitória
CS	Colateral de Schaffer
CTN	Célula-tronco neural
CTNs	Células-tronco neurais
DA	Doença de Alzheimer

DP	Doença de Parkinson
ELA	Esclerose lateral amiotrófica
EM	Esclerose múltipla
FM	Fibras musgosas
GD	Giro denteado
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
H	Hilo
IBA1	Molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1
IL	Interleucina
I.P	Intraperitoneal
LPS	Lipopolissacarídeo
NB	Neuroblasto
NeuN	Proteína nuclear específica neuronal
OCVs	Órgãos circunventriculares
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNPMF	Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos
RENAME	Relação nacional de medicamentos essenciais
RENISUS	Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao sistema único de saúde
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema nervoso central
SUS	Sistema único de saúde

TDP-43	*Transactive DNA-binding protein 43*
TLR4	Receptor do tipo Toll 4
TNF	Fator de necrose tumoral
VP	Via perfurante

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Descrição anatômica do hipocampo. 09

Figura 2. Representação das principais vias de comunicação entre as diferentes estruturas hipocampais e os principais componentes celulares da porção neurogênica 10

Figura 3. Propostas de propagações da inflamação sistêmica para o cérebro a partir de administração de LPS via cavidade intraperitoneal 17

Figura 4. Representação do teste do campo aberto .18

Figura 5. Representação do teste de reconhecimento de objetos. 19

Figura 6. Representação do teste labirinto em Y .20

Figura 7. a) *Uncaria guianensis* (Aubl.) J.F.Gmel. e b) *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roem. & Schult.) DC 23

RESUMO

Introdução: Na neuroinflamação, ocorre um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, essas moléculas são liberadas pelas células gliais, em resposta a estímulos patológicos, como infecção, trauma e doenças neurodegenerativas. A presença excessiva dessas citocinas pró-inflamatórias podem levar a disfunção sináptica, morte celular, danos neuronais e levar cronicamente a déficits de memória. **Objetivos:** Este estudo foi desenhado para caracterizar os efeitos do tratamento com Unha de Gato (UG, 30 e 100 mg/kg) no comprometimento de aprendizagem e memória, neurônios maduros, morte celular e ativação glial induzida por neuroinflamação crônica recorrente (CRN) e seus prováveis mecanismos moleculares subjacentes. **Materiais e métodos:** Foram utilizados 30 ratos Wistar machos adultos, divididos em quatro grupos: grupo veículo (VE), grupo LPS (LPS), grupo LPS + UG30 mg/kg (LPS+UG30) e grupo LPS + UG100 mg/kg (LPS+UG100), que receberam UG, via gavagem e injeção intraperitoneal de LPS a cada 5 dias por 34 dias. Utilizou-se a técnica de imuno-histoquímica para caspase-3, NeuN, Iba1 e GFAP, em cortes do giro denteado do hipocampo desses animais. A quantificação foi feita por densitometria óptica (DO). **Resultados:** A análise dos dados indicam que (1) a injeção crônica de lipopolissacarídeos (LPS) (i.p) resultou em um declínio significativo no índice de memória episódica de curto e longo prazo (tarefa de reconhecimento de objetos) e aprendizagem espacial e memória (tarefa de labirinto em Y) de ratos; (2) tratamento com ambas as doses de UG efetivamente protegeu contra comprometimento de aprendizagem e memória induzido por CRN; (3) O tratamento com UG diminuiu significativamente a expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) no giro

dentado do hipocampo (GD), ambas as doses, e na região 1 do Corno de Ammon (CA1), na dose de UG100; e aumentou a expressão da proteína nuclear neuronal (NeuN) no hipocampo DG, CA1 e região 3 do Corno de Ammon (CA3) do CRN, e o mecanismo protetor subjacente do UG pode estar envolvido na influência dos astrócitos na sobrevivência neuronal. Por outro lado, os resultados indicam que o tratamento sistêmico com UG não consegue prevenir eficazmente o aumento da expressão de Iba-1 e caspase-3 clivada induzida por CRN. **Conclusões:** Assim, a aplicação de UG na dose de 100 mg/kg exerce efeitos protetores sobre a memória, neurônios adultos e astrócitos, mas não o suficiente para reverter os efeitos da ativação microglial ou morte celular induzida pela neuroinflamação crônica.

Palavras-chave: Uncaria, Uña de Gato, neuroinflamação, memória, astrócitos.

ABSTRACT

Introduction: In neuroinflammation, there is an increase in the production of pro-inflammatory cytokines. These molecules are released by glial cells in response to pathological stimuli such as infection, trauma and neurodegenerative diseases. The excessive presence of these pro-inflammatory cytokines can lead to synaptic dysfunction, cell death, neuronal damage and chronically lead to memory deficits. **Aim of study:** Thus, this study was designed to characterize the effects of Uña de Gato (UG, 30 and 100 mg/kg) treatment on learning and memory impairment, mature neurons, cell death and glial activation induced by chronic recurrent neuroinflammation (CRN) and its probable underlying molecular mechanisms. **Material and Methods:** Thirty adult male Wistar rats were used, divided into four groups: vehicle group (VE), LPS group (LPS), LPS + UG30 mg/kg group (LPS+UG30), and LPS + UG100 mg/kg group (LPS+UG100), which received UG via gavage and intraperitoneal injection of LPS once every 5 days for a total of five administrations over the 34-day period. The immunohistochemistry technique was used for caspase-3, NeuN, Iba1, and GFAP in sections of the dentate gyrus of the hippocampus of these animals. Quantification was performed by optical densitometry (OD). **Results:** The results showed that (1) chronic injection of lipopolysaccharide (LPS) (i. p) resulted in a significant decline in short- and long-term episodic memory index (object recognition task) and spatial learning and memory (Y maze task) of rats; (2) treatment with both doses of UG effectively protected against CRN-induced impairment of learning and memory; (3) UG treatment significantly decreased glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in the dentate gyrus of the hippocampus (DG), both

doses, and in cornu Ammonis area 1 (CA1), at a dose of UG100; and increased neuronal nuclear protein (NeuN) expression in the hippocampus DG, CA1, and cornu Ammonis area 3 (CA3) of CRN, and the underlying protective mechanism of UG may be involved in the influence of astrocytes on neuronal survival. On the other hand, the results indicate that systemic treatment with UG cannot effectively prevent the CRN-induced increase in the expression of Iba-1 and cleaved caspase-3. **Conclusion:** Thus, the application of UG at a dose of 100mg/kg exerts protective effects on memory, adult neurons and astrocytes, but not enough to reverse the effects of microglial activation or cell death induced by chronic neuroinflammation.

Keywords: Uncaria, *Uña de Gato*, neuroinflammation, memory, astrocytes.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Células da glia

O estudo da aparência, propriedades fisiológicas e funções das células da glia tem sido objeto de diversas publicações recentes. A crescente evidência acumulada demonstra claramente que as células da glia, em especial os astrócitos, apresentam uma diversidade tão grande quanto os neurônios [1–3]. Estudos recentes mostram que muitos dos receptores e canais expressos nas células gliais apresentam funções similares aos dos neurônios. As células da glia possuem a capacidade de liberar gliotransmissores, permitindo que se formem redes de comunicação capazes de trocar informações por longos períodos. Além disso, elas respondem a aferências sinápticas e atuam como precursores neurais pluripotentes na neurogênese adulta. Essas descobertas ressaltam a importância das células da glia não apenas na manutenção da homeostase cerebral, mas também em processos cognitivos e de aprendizagem [1–4]. No sistema nervoso central (SNC), as principais células gliais são os astrócitos, micróglia e oligodendrócitos. Os astrócitos desempenham um papel ativo na função sináptica, integrando e processando informações sinápticas. Eles influenciam a transmissão e plasticidade sináptica, além de atuarem na manutenção do fluxo sanguíneo cerebral. Seu envolvimento em processos cognitivos e emocionais, como aprendizado e memória, tem sido cada vez mais reconhecido. Esses achados destacam a importância dos astrócitos no SNC e no papel crucial que eles desempenham no funcionamento do cérebro [5,6]. Os oligodendrócitos são células gliais especializadas na produção de mielina, que é essencial para a condução do impulso nervoso no

SNC. Já a micróglia é a principal célula imune do SNC, tendo um papel ativo no desenvolvimento cerebral. Ela expressa receptores capazes de identificar restos celulares, antígenos, células apoptóticas e tumorais, permitindo que ela exerça funções importantes na defesa e reparo cerebral. A micróglia também desempenha um papel fundamental na modulação de respostas inflamatórias e na regulação do ambiente neuronal. O entendimento dessas funções é crucial para o desenvolvimento de novas terapias para doenças neurodegenerativas e inflamatórias [3,6].

A glia, especialmente os astrócitos, não é mais vista como simples "cola" que une os neurônios no SNC, mas sim como um participante ativo da rede neuronal. As células da glia possuem muitos dos mesmos receptores que os neurônios, indicando que elas são capazes de “falar” e “compreender” a mesma linguagem química dos neurônios. Esses achados reforçam a importância da glia na função cerebral e indicam que uma compreensão mais aprofundada do papel das células gliais é essencial para o avanço no entendimento de doenças neurológicas e no desenvolvimento de novas terapias [1,7]. Considerar as redes de neurônios isoladamente não é mais suficiente, já que as células gliais trabalham em conjunto com os neurônios para formar os circuitos e redes do SNC. A glia deixa de ser vista como apenas um suporte neural e passa a ser reconhecida como participante ativo na fisiologia neural. Devido à importância crescente das comunicações neurônio-glial e as descobertas obtidas em muitos estudos anteriores, é plausível supor que a disfunção na comunicação neurônio-glia tenha um papel significativo nas doenças degenerativas do cérebro humano. Evidências recentes sugerem que a disfunção na interação entre neurônios e células gliais

está associada a várias doenças neurológicas, incluindo esclerose múltipla (EM), doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson (DP) e epilepsia. Essas descobertas destacam a importância de entender melhor a natureza e os mecanismos subjacentes à comunicação neurônio-glial em condições saudáveis e patológicas, a fim de desenvolver novas estratégias terapêuticas para essas doenças [8].

Embora as células gliais não sejam capazes de gerar impulsos elétricos como os neurônios, elas desempenham um papel crucial no suporte e manutenção da atividade neuronal. Uma das principais formas pelas quais as células gliais afetam a atividade neuronal é por meio da liberação de neurotransmissores e outros sinais químicos. Por exemplo, as células gliais liberam glutamato, um neurotransmissor excitatório, que pode afetar a atividade dos neurônios próximos [9]. Além disso, as células gliais também podem afetar a atividade neuronal ao remover neurotransmissores do espaço extracelular, impedindo a sua ação prolongada [10].

Outra forma pela qual as células gliais influenciam a atividade neuronal é por meio da regulação da formação e estabilidade de sinapses. As células gliais podem secretar moléculas que promovem a formação de novas sinapses e ajudam a estabilizar as sinapses existentes. Elas também podem auxiliar na remoção de sinapses não utilizadas, um processo importante para a plasticidade sináptica [11].

Falando em plasticidade sináptica, as células gliais também desempenham um papel fundamental nesse processo. Elas podem liberar fatores que afetam a plasticidade sináptica, como o fator de crescimento de células gliais (GDNF) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Esses

fatores podem afetar a força das sinapses e a sua capacidade de mudar em resposta a estímulos ambientais [11,12].

Como mencionado anteriormente, as células gliais também estão envolvidas em doenças neurológicas, incluindo EM, DA e DP. Na esclerose múltipla, por exemplo, as células gliais são ativadas de maneira anormal e levam a uma inflamação crônica que resulta na destruição da mielina, o que prejudica a transmissão de sinais elétricos entre os neurônios [13,14]. Na doença de Alzheimer, as células gliais têm um papel importante na formação de placas amiloides que se acumulam no cérebro, causando danos neuronais e levando à perda de memória e função cognitiva [10]. Já na doença de Parkinson, as células gliais são responsáveis pela liberação de substâncias inflamatórias que prejudicam os neurônios produtores de dopamina, o que resulta na degeneração desses neurônios e na manifestação dos sintomas da doença [15].

1.2 Astrócitos e a sua função no sistema nervoso central

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, a neurogênese é o processo de formação de neurônios [16] e a gliogênese é o processo de formação de células gliais, incluindo os astrócitos [17]. Os astrócitos são células gliais encontradas no SNC que desempenham várias funções, incluindo o fornecimento de suporte estrutural aos neurônios, manutenção do ambiente iônico, integridade da barreira hematoencefálica e controle do fluxo sanguíneo cerebral [18].

Os astrócitos têm origem embrionária comum com os neurônios, a partir das células-tronco neurais pluripotentes. No entanto, durante a gliogênese, as células-tronco neurais pluripotentes se diferenciam em células progenitoras

gliais, que posteriormente se diferenciam em astrócitos. Os astrócitos são gerados em diferentes regiões do SNC em momentos diferentes durante o desenvolvimento. Durante o desenvolvimento embrionário, os astrócitos se originam da zona ventricular do tubo neural. Já durante o desenvolvimento pós-natal, os astrócitos se originam de zonas específicas do cérebro, como a zona subventricular e a zona subgranular do giro dentado do hipocampo [19].

Existem dois tipos principais de astrócitos, os protoplasmáticos e os fibrosos, que possuem morfologias distintas e são proeminentemente encontrados na substância cinzenta e branca do cérebro e medula espinhal, respectivamente. Adicionalmente, há algumas células astrogliais especializadas, tais como as células de Müller presentes na retina e as células gliais de Bergmann encontradas no cerebelo [20]. Os astrócitos protoplasmáticos possuem uma distribuição predominante na substância cinzenta e seus prolongamentos estabelecem contato com sinapses e vasos sanguíneos, chegando a aproximadamente 100.000 sinapses por astrócito. Sua forma é arredondada, com múltiplos ramos principais que se ramificam uniformemente em processos altamente ramificados. Em contrapartida, os astrócitos fibrosos são predominantemente encontrados na substância branca, e estabelecem conexões com os nodos de Ranvier e os vasos sanguíneos. Eles possuem uma menor quantidade de ramificações em relação aos astrócitos protoplasmáticos, com prolongamentos mais longos e fibrosos [21].

As células astrogliais desempenham papéis importantes tanto em condições normais quanto patológicas. Em situações fisiológicas normais, elas regulam a movimentação e distribuição da água, além de controlarem as concentrações extracelulares de íons potássio [6]. Os astrócitos também

desempenham uma função vital no suporte metabólico dos neurônios, captando glicose dos vasos sanguíneos adjacentes e convertendo-a em lactato para ser utilizada pelos neurônios [22]. No entanto, em condições patológicas, a funcionalidade dos astrócitos pode ser comprometida, o que pode expor os neurônios à excitotoxicidade e estresse oxidativo, favorecendo o desenvolvimento de distúrbios neurodegenerativos [8].

Além disso, os astrócitos desempenham uma ampla gama de funções no cérebro, incluindo o seu papel fundamental na sinaptogênese, maturação sináptica, homeostase de neurotransmissores, microcirculação cerebral e metabolismo cerebral, bem como na formação e manutenção da barreira hematoencefálica [8,23]. No entanto, sob condições de estresse ou doença, essas células podem apresentar disfunções que comprometem a homeostase neural, liberando excesso de glutamato e Ca^{2+} citotóxicos que podem ativar proteases de cisteína dependentes de cálcio (calpaínas) e levar à morte neuronal [3,24]. Além disso, o mau funcionamento dos astrócitos no tamponamento de íons extracelulares, como o K^{+}, pode resultar em superexcitação neuronal [3,25]. É importante destacar que astrócitos reativos podem afetar negativamente todas essas funções. Eles também têm a capacidade de se comunicar com as células circundantes através de canais da membrana plasmática, transportadores, receptores e certas moléculas, além de sofrer exocitose ou endocitose [3,26].

A comunicação intercelular é essencial para que as células do sistema nervoso possam se comunicar e coordenar funções. Os astrócitos são importantes nesse processo, pois eles são capazes de se comunicar entre si e com outras células nervosas por meio de diferentes mecanismos. As junções

comunicantes (gap junctions) são canais de comunicação direta entre células adjacentes, formados por conexinas. Os astrócitos apresentam muitas gaps junctions, permitindo uma rápida troca de íons e moléculas entre eles. Essa comunicação intercelular pode ter um papel importante na sincronização de atividade neuronal e na regulação do fluxo sanguíneo cerebral 27.

O processo de astrogliose envolve alterações estruturais e moleculares da astroglia, incluindo diferentes tipos de células gliais (micróglia, astrócitos e progenitores oligodendrócitos), que podem ser desencadeadas por danos ao SNC e por doenças que envolvem uma resposta multicelular complexa. As alterações nos astrócitos reativos variam de acordo com a gravidade da lesão e formam um gradiente contínuo, considerando a heterogeneidade e diversidade dessas células. Tais mudanças podem resultar em ganho ou perda de função para os astrócitos [28,29].

1.2.1 Reatividade astrocitária

A reatividade dos astrócitos é um processo complexo que pode ter diferentes graus de severidade e impacto. A reatividade leve a moderada dos astrócitos pode levar a hipertrofia no corpo celular, sem perda substancial dos domínios dos astrócitos e sem proliferação significativa. Em contraste, na reatividade severa e difusa, ocorre uma pronunciada marcação da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), hipertrofia, proliferação de astrócitos, alguma perda substancial dos domínios dos astrócitos e uma sobreposição dos processos dos astrócitos vizinhos. A formação da cicatriz astroglial ocorre a partir de astrócitos que recém proliferaram e com prolongamentos que se entrelaçam sobre os processos celulares, formando delimitações compactas que

demarcam as áreas de danos, como necrose, inflamação, trauma, entre outros. No entanto, a formação dessas cicatrizes pode inibir a regeneração do axônio, o que pode ser o efeito mais prejudicial causado pela astrogliose [10,31].

A GFAP é um marcador utilizado para indicar a reatividade astrocitária. É uma proteína filamentosa que é expressa predominantemente por astrócitos altamente regulada em resposta a danos no sistema nervoso central. A superexpressão da GFAP em astrócitos tem sido associada à diversas condições patológicas do sistema nervoso central, como lesões cerebrais ou doença cerebral [30].

1.3 Hipocampo

O hipocampo é uma região do cérebro que desempenha um papel fundamental na formação e recuperação da memória. Ele está localizado no lobo temporal e faz parte do sistema límbico, que é responsável pelo controle das emoções, comportamento e memória. Além do hipocampo, o sistema límbico inclui outras áreas do cérebro, como o córtex entorrinal, giro cingulado, giro para-hipocampal, amígdala, área septal e hipotálamo [31,32].

O hipocampo é composto por duas finas camadas de neurônios, a camada interna é denominada giro denteado (GD) e a externa é o Corno de Ammon (CA), que é dividido em quatro regiões: CA1, CA2, CA3 e CA4 (Figura 1). Cada uma dessas regiões tem sua própria estrutura e funções específicas. O giro denteado é responsável por receber informações da região do córtex cerebral conhecida como córtex entorrinal, que é importante para a memória espacial. O CA é responsável por receber informações do giro denteado e está envolvido na consolidação da memória de curto prazo em memória de longo

prazo [31,32], o CA1 reprocessa informações associativas de CA3 e as transmite de volta ao córtex entorrinal [33].

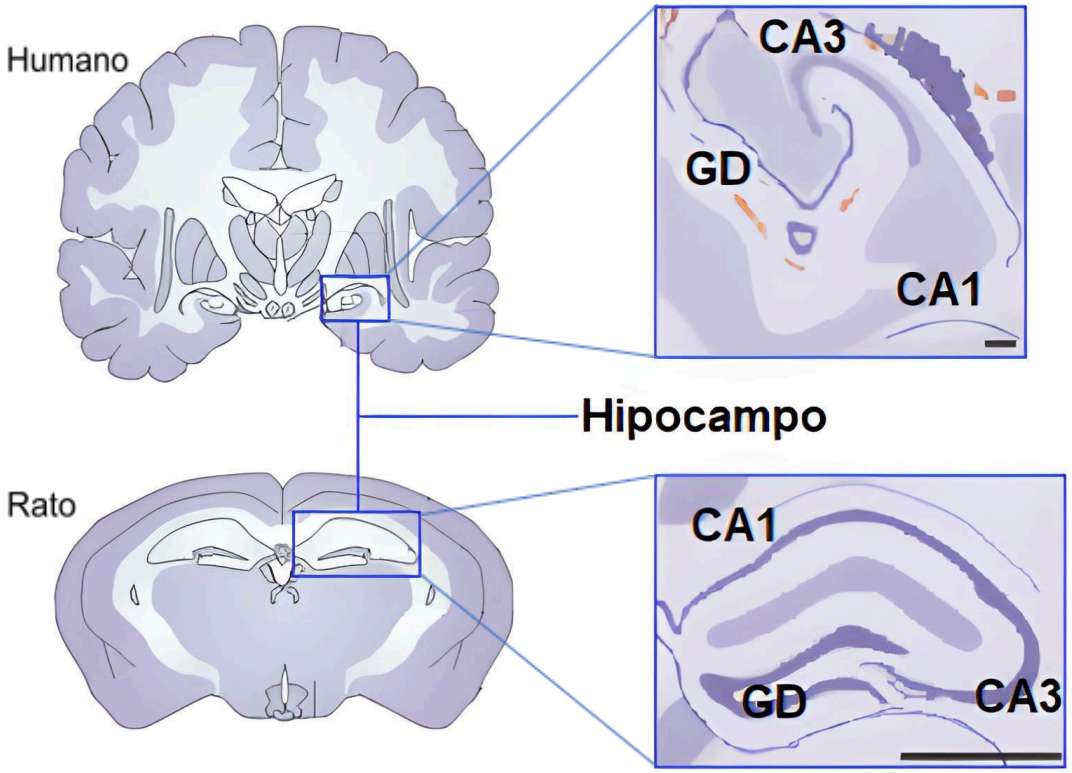


Figura 1. Descrição anatômica do hipocampo. Vistas coronais do cérebro humano (superior) e do rato (inferior) com destaque para o hipocampo, incluindo o giro denteado (GD) e o Corno de Ammon (CA1 e CA3). Barra de escala de 1mm [34,35].

O GD é uma das principais áreas do hipocampo, composto por três camadas distintas que desempenham funções específicas. A camada molecular (CM), a primeira camada do GD, é composta por projeções dendríticas de células granulares (CG) jovens e maduras, que são um tipo de neurônio glutamatérgico. A camada de células granulares (CCG) é a segunda camada do GD, que contém o soma das CGs e é importante para a integração de informações sensoriais. A terceira camada, a camada polimórfica ou hilo (H), é a camada mais profunda do GD, onde se encontram as células

musgosas e outros interneurônios que desempenham um papel fundamental na regulação da atividade neuronal. Juntas, essas três camadas do GD colaboram para processar informações e formar novas memórias (Figura 2) [36].

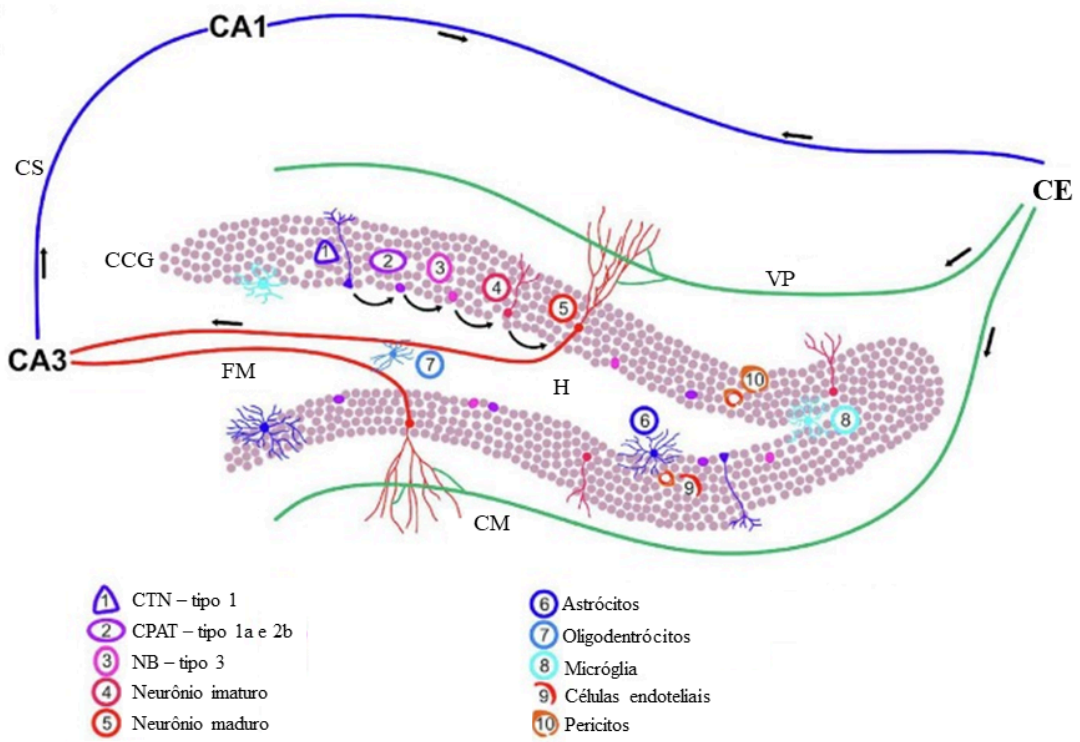


Figura 2. Representação das principais vias de comunicação entre as diferentes estruturas hipocampais e os principais componentes celulares da porção neurogênica. CM, camada molecular; CCG , camada de células granulares; H, hilo; CA1, *Cornu ammonis* 1 *;* CA3, *Cornu ammonis* 3; CE, córtex entorrinal; VP, via perfurante ; FM, fibras musgosas ; CS, Colateral de Schaffer ; CTN , célula-tronco neural; CPAT, célula progenitora amplificadora transitória; NB, neuroblasto. Modificado de DOMÍNGUEZ-RIVAS *et al*., 2021 [36].

A neurogênese adulta é um processo fascinante que tem sido estudado extensivamente nas últimas décadas. Ela ocorre em várias regiões do cérebro adulto, incluindo a zona subventricular dos ventrículos laterais e a zona subgranular do giro denteado no hipocampo. Essas regiões contêm células-tronco neurais (CTNs) que podem se diferenciar em neurônios e outros tipos celulares [17].

A capacidade de gerar novos neurônios no cérebro adulto tem implicações significativas para a neuroplasticidade e a capacidade de aprendizado e memória. Embora inicialmente tenha sido descoberta em roedores, a neurogênese adulta também foi demonstrada em seres humanos, apesar de que a extensão e importância desse processo no cérebro humano ainda estejam sendo investigadas. Para avaliar a presença de neurônios pós-mitóticos, a proteína nuclear específica neuronal (NeuN) é frequentemente utilizada como um marcador com base em suas propriedades, incluindo sua localização nuclear [37,38].

Quando a neurogênese é prejudicada, como em condições de envelhecimento ou lesão cerebral, há relatos de distúrbios neurodegenerativos e neuropsiquiátricos, incluindo a doença de Parkinson, doença de Alzheimer e distúrbios depressivos graves. Por outro lado, a estimulação da neurogênese pode ter efeitos positivos, como a melhoria da capacidade de aprendizado e memória, bem como a redução da ansiedade e depressão [39]. A apoptose é um processo programado de morte celular que ocorre em condições normais e patológicas [40]. A ativação da caspase-3, uma enzima proteolítica, é um dos principais marcadores da apoptose e está envolvida em vários processos patológicos no cérebro, como hipóxia, isquemia cerebral focal, agregados extracelulares de TDP-43, entre outros [41].

Além disso, outros fatores como a deposição de placas amilóides e emaranhados neurofibrilares, inflamação crônica e estresse oxidativo também contribuem para a morte neuronal na doença de Alzheimer. A morte neuronal nessa doença leva a uma perda progressiva de função cognitiva e é

responsável pela deterioração da memória, aprendizagem e outras funções cerebrais [42].

A plasticidade sináptica pode ocorrer em diferentes níveis, desde as alterações moleculares em receptores e canais iônicos até a formação de novas sinapses ou eliminação de sinapses existentes. Essas mudanças sinápticas podem ser mediadas por diferentes mecanismos, como a modificação da eficácia sináptica (por exemplo, por meio da modulação dos receptores glutamatérgicos), a expressão de novas proteínas e a ativação de vias de sinalização intracelular. A plasticidade sináptica é fundamental para a adaptação do sistema nervoso às mudanças ambientais e à aprendizagem, mas também pode estar envolvida em processos patológicos, como a epilepsia e o transtorno de estresse pós-traumático. Além disso, a diminuição da plasticidade sináptica pode ser um fator contribuinte para o declínio cognitivo relacionado à idade e doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer [43].

1.4 Doenças neurodegenerativas e neuroinflamação

As doenças neurodegenerativas são um grupo de doenças que afetam o sistema nervoso central ou periférico, caracterizadas pela progressiva degeneração estrutural e funcional dos neurônios, resultando em diversos problemas mentais e de movimento. Essa degeneração pode ser causada por uma variedade de fatores patológicos, incluindo excitotoxicidade, estresse oxidativo, disfunção celular e neuroinflamação. É importante destacar que a neurodegeneração está diretamente relacionada à idade, sendo mais comum em indivíduos idosos. A doença de Alzheimer, esclerose múltipla, doença de

Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (ELA) são exemplos de doenças neurodegenerativas que afetam milhões de pessoas em todo o mundo, e que ainda não têm cura. No entanto, avanços em pesquisas e tratamentos têm proporcionado uma melhor qualidade de vida para os pacientes e suas famílias [44].

A inflamação é um processo biológico complexo e essencial para a defesa do organismo contra patógenos invasores e para a reparação de tecidos danificados. A via neuroinflamatória, composta por células gliais e neuronais, pode ser ativada a partir de diversos fatores, como insultos patológicos, infecções, traumas, antecedentes genéticos, fatores ambientais e a idade. Embora a neuroinflamação possa ser benéfica em muitas situações, sua ativação excessiva ou prolongada pode levar a danos neuronais e contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças, incluindo as neurodegenerativas. A compreensão dos mecanismos envolvidos na neuroinflamação é essencial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que possam modular essa resposta e prevenir ou tratar essas doenças [45,46].

Há dois tipos de inflamação: a aguda e a crônica. No sistema nervoso, a inflamação aguda é desencadeada em resposta a uma lesão ou infecção e tem como objetivo limitar a extensão do dano e promover a reparação do tecido cerebral danificado. Essa resposta inflamatória aguda é controlada e autolimitante, e normalmente não causa danos permanentes ao tecido nervoso. Por outro lado, a inflamação crônica é um processo prolongado e mal regulado que pode ser prejudicial ao tecido nervoso. Ela é caracterizada pela infiltração de células imunes, como células gliais e linfócitos T, e pela liberação de

mediadores inflamatórios que podem contribuir para o dano neuronal. A inflamação crônica está presente em várias doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer, a esclerose múltipla e a doença de Parkinson. Alguns estudos sugerem que a inflamação crônica pode ser um fator desencadeante ou contribuinte para o desenvolvimento dessas doenças. Por isso, o controle da inflamação crônica no cérebro é uma área de grande interesse na pesquisa em neurociência e pode levar ao desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de doenças neurodegenerativas [47].

A barreira hematoencefálica (BHE) é uma estrutura física que envolve o sistema nervoso central e protege contra a entrada de células imunes e substâncias prejudiciais provenientes do sangue. As células gliais são essenciais para a função do sistema neuroimune, pois elas atuam de forma ativa na regulação da inflamação, produção de antioxidantes e reparo celular. A fagocitose é uma das funções das células gliais, que consiste na eliminação de substâncias tóxicas do ambiente cerebral. Além disso, elas também liberam esteroides e outras moléculas anti-inflamatórias para combater a inflamação excessiva. No entanto, quando as células gliais se encontram em desequilíbrio, podem desencadear danos neurais, como a disfunção sináptica, perda de sinapses e morte neuronal [48,49]. As células gliais, além de estarem envolvidas na neuroinflamação, também desempenham um papel fundamental como marcadores patológicos em várias doenças neurodegenerativas. Elas são capazes de responder a insultos patológicos, produzir e secretar moléculas sinalizadoras e influenciar a sobrevivência de neurônios adjacentes. Nas doenças neurodegenerativas, a ativação prolongada das células gliais pode resultar em danos aos neurônios e contribuir para a progressão da doença [3].

Na neuroinflamação, ocorre um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina 1 beta (IL-1β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 18 (IL-18), fator de necrose tumoral (TNF), quimiocinas da família CC e da família CXC, prostaglandinas, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio. Essas moléculas são liberadas pelas células gliais, em resposta a estímulos patológicos, como infecção, trauma e doenças neurodegenerativas. A presença excessiva dessas citocinas pró-inflamatórias pode levar a danos neuronais, disfunção sináptica e morte celular [45,46].

O gene IBA1, também conhecido como AIF-1 (fator inflamatório aloenxerto-1), é um importante marcador de células microgliais. A expressão de IBA-1 está relacionada à ativação celular e suas funções incluem fagocitose, proliferação, migração e produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, Iba1 também pode ser utilizado como um indicador de patologia em várias doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer, Parkinson e esclerose múltipla. Portanto, a detecção e análise de Iba1 é crucial para entender o papel das células microgliais na neuroinflamação e no desenvolvimento dessas doenças [50].

O uso de *Uncaria tomentosa* tem sido estudado como uma possível terapia complementar no controle da neuroinflamação em doenças neurodegenerativas. Alguns estudos *in vitro* e em modelos animais mostraram que extratos de *U. tomentosa* podem reduzir a expressão e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa e interleucinas, através de mecanismos que envolvem a modulação da ativação de células gliais e a inibição de vias de sinalização inflamatórias [51,52]. Quando a BHE é comprometida, seja por danos bioquímicos ou mecânicos, pode haver invasão

de células endoteliais capilares e sanguíneas, que também contribuirão para o processo de neuroinflamação [46].

1.4.1 Lipopolissacarídeo

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma substância que pode causar inflamação no SNC, sendo amplamente utilizado em estudos experimentais para induzir modelos de neuroinflamação [53]. É composto por uma camada lipídica hidrofóbica e uma camada polissacarídica hidrofílica, sendo a camada lipídica responsável pela ação antigênica do LPS [54]. Além disso, o LPS é encontrado no folheto externo de bactérias Gram-negativas [55,56].

O LPS pode ser administrado por via intracerebroventricular ou intraperitoneal [53,57]. A administração intraperitoneal é uma opção não invasiva e amplamente utilizada na pesquisa em neuroinflamação [36]. Quando o LPS entra no cérebro, ele ativa as células da glia através do receptor tipo Toll 4 (TLR4). A ativação da microglia e dos astrócitos pelo LPS resulta na liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-1, IL-6, bem como espécies reativas de oxigênio [58].

Ao administrar o LPS através da cavidade intraperitoneal, ele ativa receptores específicos, os receptores tipo Toll (TLR), em macrófagos peritoneais. Isso leva à produção de citocinas inflamatórias, como IL1, TNF-α e IL-6. A comunicação da inflamação sistêmica com o cérebro ocorre através da IL-1, que é produzida peritonealmente e se liga ao receptor de IL-1 do nervo vago, que tem inervação abdominal. O terminal do nervo vago no trato solitário é o local onde a resposta aguda à doença é mediada. É importante ressaltar que o LPS é capaz de comprometer a integridade da BHE [36], permitindo a

entrada de células imunes periféricas que ativam as células gliais e levam à neuroinflamação. Além disso, as citocinas sistêmicas podem invadir os órgãos circunventriculares (OCVs) próximos aos terceiro e quarto ventrículos, que não possuem BHE, e ativar as células gliais presentes nessa região. As moléculas inflamatórias provenientes dos OCVs têm acesso ao líquido cefalorraquidiano ventricular, que pode propagar-se para outras regiões cerebrais, como no caso do TNF-α [59–61] (Figura 3).

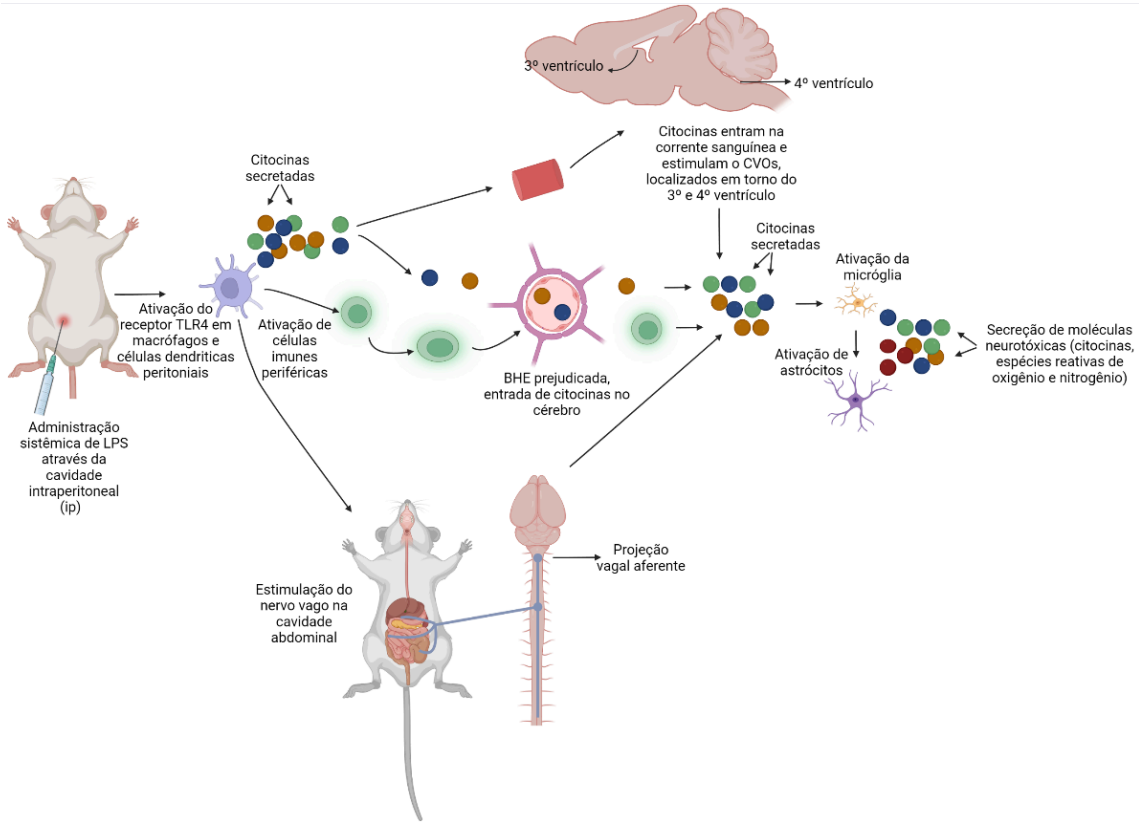


Figura 3. Propostas de propagações da inflamação sistêmica para o cérebro a partir de administração de LPS via cavidade intraperitoneal. Adaptado de Deng *et al*., 2020 [61].

1.5 Avaliação do comportamento e de déficits de memória em roedores

A avaliação do comportamento e déficits de memória em modelos animais é parte da rotina da pesquisa em neurociências. A partir de testes comportamentais é possível avaliar a ansiedade, cognição e memória de

modelos animais, em geral roedores, onde é possível observar comportamentos análogos ao visto em humanos e a partir disso testar tratamentos [62].

1.5.1 Teste do campo aberto

O teste de campo aberto tem como objetivo avaliar a ansiedade, atividade locomotora e atividade exploratória dos animais em um ambiente novo [63]. A arena, ou aparato, pode ser uma estrutura quadrada ou redonda e suas dimensões variam, tendo tamanhos diferentes por conta do modelo a ser utilizado, como por exemplo ratos ou camundongos. O aparato possui uma parede alta e é dividido em quadrantes de tamanhos iguais (Figura 4). O animal permanece no aparato pode um tempo pré-determinado, geralmente 5 minutos. A análise é feita observando parâmetros como o tempo de permanência no centro e periferia do aparato, número de cruzamentos entre os quadrantes e o ato de levantar-se [64]. O centro do aparato é considerado como um local ansiolítico, ou seja, um maior tempo de exploração neste local remete ao uso de substâncias que causam ansiedade [63].

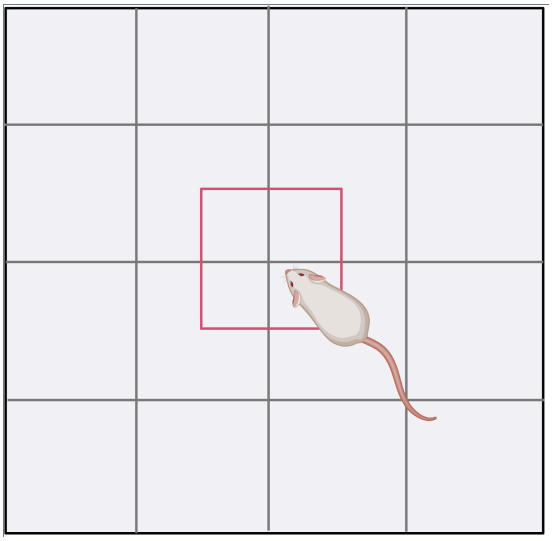


Figura 4. Representação do teste do campo aberto. Figura criada em Biorender.com.

1.5.2 Reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos tem como finalidade avaliar a memória dos modelos animais. Vinte e quatro horas após o teste de campo aberto, que também é utilizado como habituação ao aparelho, os animais são colocados individualmente no aparato com dois objetos iguais, equidistantes entre si e da parede (Figura 5). Os animais, terão um tempo pré-determinado, geralmente 5 minutos, para explorar os objetos. Após 4 horas da fase de treino eles retornam ao mesmo aparato com 2 objetos na mesma posição, sendo que um desses objetos é novo. Após 24 horas da sessão treino, o animal é apresentado a um terceiro objeto novo. São considerados como ato de explorar quando o animal direciona o focinho para o objeto e a avaliação da tarefa consiste na diferença do tempo de exploração do objeto novo em detrimento do objeto já conhecido. Este teste fornece informações sobre a memória e as habilidades cognitivas do animal. Isso ocorre porque animais com boa memória tendem a examinar novos objetos por mais tempo [64].

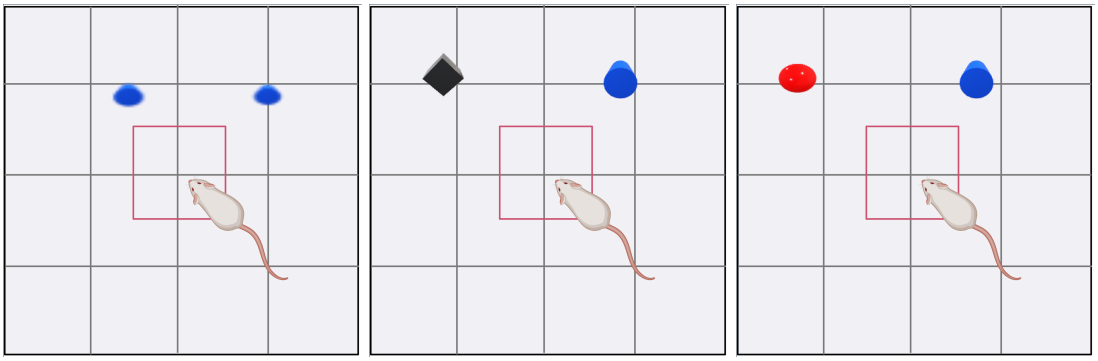


Figura 5. Representação do teste de reconhecimento de objetos. Figura criada em Biorender.com.

1.5.3 Labirinto em Y

Com o propósito de avaliar a capacidade de aprendizado e memória espacial em roedores é comumente utilizado o labirinto em Y. Onde é possível observar a preferência natural do animal em explorar ambientes novos. O teste é realizado em um aparato em forma de Y com uma parede alta (Figura 6). O animal, na sessão de treino, é colocado no aparato e pode explorar o local por 5 minutos, nessa sessão um dos braços está bloqueado. Na sessão teste, 4 horas depois, o terceiro braço é aberto e o animal pode explorar o aparato por 5 minutos. Esse teste avalia a capacidade do animal de lembrar qual braço foi explorado, o que pode indicar o desenvolvimento da memória espacial [64,65].

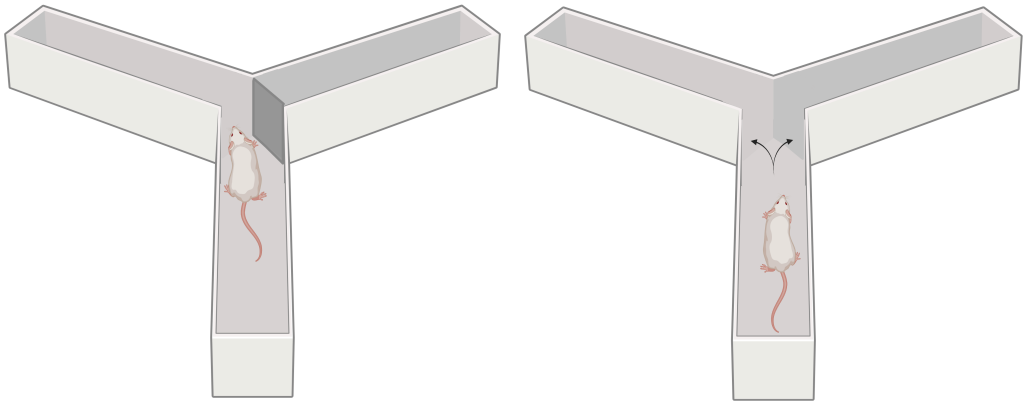


Figura 6. Representação do teste labirinto em Y. Figura criada em Biorender.com.

1.6 Fitoterápicos e saúde pública

De acordo com um levantamento realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população de países em desenvolvimento utiliza práticas tradicionais como cuidados primários à saúde, sendo que aproximadamente 85% dessas práticas envolvem o uso de plantas medicinais. O uso de plantas medicinais e fitoterapia apresenta grande importância, pois

amplia os recursos terapêuticos disponíveis, reconhece e valoriza o conhecimento popular, incentiva a preservação da biodiversidade e apoia a agroecologia ambiental [66].

No Brasil, a população tem acesso universal e gratuito a serviços de saúde ao longo de toda a vida, por meio do Sistema Único de Saúde (SUS). O SUS foi criado em 1988 pela Constituição Federal Brasileira e, posteriormente, foi regulamentado pela Lei Orgânica da Saúde nº 8.080/90, que detalha os seus princípios e funcionamento. Desde então, o SUS oferece atendimento desde procedimentos básicos, como aferição da pressão arterial, até procedimentos mais complexos, como transplantes de órgãos. Todos os procedimentos são realizados de forma integral e gratuita para a população brasileira, com ênfase na promoção da saúde, prevenção de doenças e tratamento para todos os cidadãos, independentemente de sua condição social, econômica ou de saúde [67].

Em 22 de junho de 2006, o Governo Federal aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), através do decreto nº 5.813. Esta política tem como principal objetivo garantir o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, valorizando o conhecimento tradicional associado às suas práticas de utilização. A PNPMF contribui para a consolidação do uso de produtos naturais em tratamentos de saúde, de forma integrativa com a medicina convencional, disponibilizando alternativas terapêuticas seguras e eficazes para os pacientes da rede pública de saúde. Além disso, a PNPMF também incentiva a pesquisa e o desenvolvimento de novos fitoterápicos, gerando conhecimento científico e tecnológico na área [68].

Em 2009, o Ministério da Saúde implementou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), que lista 71 espécies de plantas medicinais [69,70]. O SUS também possui a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), que atende às necessidades primárias de cuidados à saúde. Dentre as plantas medicinais listadas na RENISUS e RENAME, destaca-se a *Uncaria tomentosa*, que possui registro sanitário junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e é considerada um fitoterápico seguro e eficaz para uso em tratamentos de saúde [71,72]. A inclusão dessa planta em tais relações fortalece sua importância na medicina popular e amplia o acesso da população aos seus benefícios terapêuticos, com segurança e qualidade. Por outro lado, apesar de não estar presente em nenhuma das listas mencionadas, a *Uncaria guianensis* possui alcaloides oxindólicos pentacíclicos como marcadores químicos, igualmente à *U. tomentosa*, além de ter uma ocorrência na natureza maior quando comparada à esta [68].

1.7 *Uncaria*

O gênero *Uncaria,* pertencente à família Rubiaceae, possui 34 espécies descritas, encontradas em florestas tropicais no sudeste da Ásia, África, Austrália e América. Na região da América do Sul e Central são encontradas duas espécies, a *Uncaria guianensis* e a *Uncaria tomentosa*, que são conhecidas popularmente como unha de gato [73]. A *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roem. & Schult.) DC é uma planta arbustiva, com ocorrência na Floresta Amazônica brasileira e peruana [74,75]. É uma liana, com espinhos curvados e pontiagudos. Seu caule principal pode ter o diâmetro superior a 20 cm. Seu epíteto específico, *tomentosa*, é devido às finas nervuras observadas na face

abaxial da sua folha [76,77]. Sua característica de trepadeira permite que ela cresça se enrolando em si mesma ou em árvores ao seu redor, podendo atingir mais de 30 metros de comprimento, levando em torno de 20 anos para atingir a maturidade [78,79]. A *Uncaria guianensis* (Aubl.) J.F.Gmel. pode atingir um comprimento de até 20 metros e um diâmetro de 10 centímetros. Sua principal característica é a presença de espinhos com a ponta dobrada para dentro, o que torna sua aderência às árvores mais difícil [78] (Figura 7).

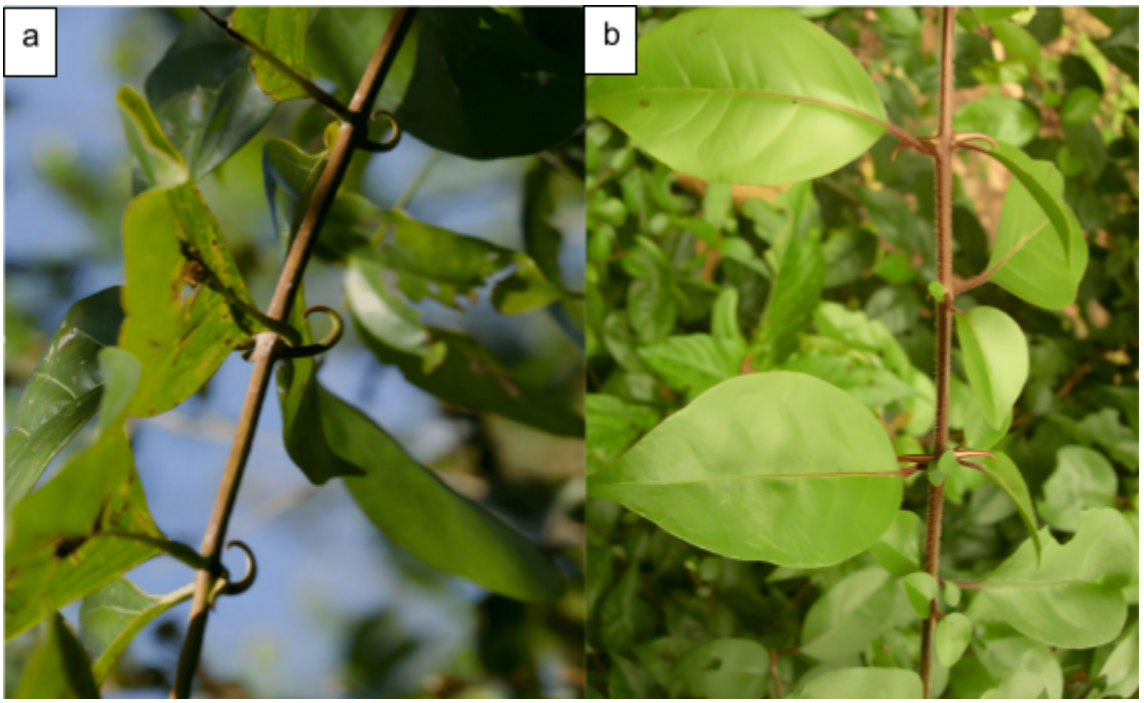


Figura 7. a) *Uncaria guianensis* (Aubl.) J.F.Gmel. e b) *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roem. & Schult.) DC. Fonte: adaptado de Valdiviezo *et al*., 2020 [80].

A floresta amazônica abriga uma variedade de plantas. Muitos povos indígenas utilizam os compostos naturais de diferentes plantas para tratamento de doenças. Por conta disso, o conhecimento dos usos etnobotânicos são uma fonte de grande relevância para a descoberta da capacidade medicinal dos produtos naturais [81]. Porém, as espécies de *Uncaria* nativas da América do Sul

e Central estão em declínio devido ao desmatamento e extração indiscriminada de partes da planta para usos fitoterápicos [82,83].

A unha de gato tem sido utilizada medicinalmente há pelo menos 2000 anos pelos grupos indígenas Aguaruna, Asháninka, Cashibo, Conibo e Shipibo do Peru e pelos grupos indígenas brasileiros Asháninka, Boras and Kaíapor [78,84]. O grupo indígena Asháninka, que habita a região central da Amazônia Peruana e a região norte do Vale do Juruá no Acre, tem os registros mais antigos em relação ao uso da unha de gato, além de serem a sua maior fonte [78,85].

Os extratos aquosos das cascas do caule e das raízes são utilizados com finalidade terapêutica para doenças inflamatórias, reumatismo, artrite, doenças cardíacas, diabetes e câncer [75,86–89]. Estudos avaliando as bioatividades de extratos e compostos da unha de gato resultam em propriedades antioxidantes, antimicrobiana, no controle da glicemia, anti-inflamatória, imunoestimulantes, anticancerígena, bem como efeito indutor de apoptose e inibição da proliferação tumoral em linhagens de células tumorais [86,90–93].

A *U. tomentosa* é mais estudada e com maior procura comercial, isto deve-se ao fato de que é a espécie do gênero na qual já foi identificado o maior número de compostos [88,94]. Entre os diversos constituintes químicos já caracterizados desta planta, destacam-se os alcaloides oxindólicos que são reconhecidos como os marcadores fitoquímicos desta espécie por estarem associados a várias de suas ações farmacológicas [51,76,87,88,95]. Juntamente com os alcaloides oxindólicos, também se destaca a presença dos seus precursores, alcaloides indólicos, sendo que alguns destes são conhecidos

desde a década de 70 [73,76,96]. Além da presença dos alcaloides, as análises fitoquímicas indicam a presença de outros compostos como: proantocianidinas, glicosídeos de ácido quinóvico, taninos, polifenóis, catequinas, beta-sitosterol, proteínas, entre outras substâncias presentes em menores concentrações [97,98].

A *U. guianensis* apresenta uma variedade de compostos em várias partes da planta. Dentre eles, destacam-se os alcaloides indólicos e oxindólicos, que possuem propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias [92]. As proantocianidinas, por sua vez, atuam como antioxidantes, protegendo as células do organismo contra o estresse oxidativo [88]. Já os flavonóis possuem ação anti-inflamatória [99,100]. Além disso, a presença da kaempferitrina, um marcador químico específico da *U. guianensis*, contribui para a identificação e padronização da espécie em estudos científicos [80,101,102].

Para Heitzman e col [81] os efeitos biológicos encontrados para esta planta estão associados aos alcaloides oxindólicos pentacíclicos, assim como outros pesquisadores afirmam esta relação [88,103]. Entretanto, outros estudos demonstraram um efeito sinérgico da combinação dos compostos desta planta, como por exemplo, para o efeito anti-inflamatório [95,104].

Os compostos naturais possuem atividades biológicas distintas, como efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e anti-apoptóticos. A bibliografia tem inúmeros estudos com produtos naturais como alternativa para tratamento de neurodegeneração [105].

Alguns estudos têm avaliado o potencial neuroprotetor da *U. tomentosa* em relação a memória e ao aprendizado [106] na redução de depósitos de filamentos/fibrilas helicoidais emparelhados com a proteína tau, que é o principal componente dos emaranhados neurofibrilares, característicos da

doença de Alzheimer [79]. Além disso, neste mesmo estudo, a *U. tomentosa* foi capaz de impedir a formação/agregação de fibrilas beta-amilóides (Aβ) pré-formadas, demonstrando o seu vigoroso efeito neuroprotetor em condições patológicas na doença de Alzheimer. Ademais, o efeito de compostos polifenólicos recentemente identificados na *U. tomentosa,* que apresentam essa atividade inibitória na formação das placas senis e emaranhados neurofibrilares, tem como um dos principais polifenóis a epicatequina-4β-8-epicatequina (ou seja, um dímero de epicatequina conhecido como proantocianidina B2), que foi identificado também em melhorar a memória de curto prazo em um modelo animal transgênico para a proteína precursora Amiloide (APP) [79].

Em outro estudo, Castilhos e col (2020), avaliaram a cognição, memória e aprendizagem em grupos de ratos de meia-idade tratados por um mês e grupos tratados por um ano com extrato de *U. tomentosa*. Houve diminuição significativa da atividade AChE nos dois grupos. No teste de latência de escape, foi demonstrado um aprimoramento cognitivo, melhora da memória e aprendizado. E no ensaio cometa, os níveis de dano oxidativo ao ADN no córtex apresentaram redução[107].

Outras espécies do mesmo gênero da *U. tomentosa* já foram testadas quanto ao seu potencial neuroprotetor. Usada tradicionalmente na Ásia para tratamento de sintomas semelhantes à doença de Parkinson, a *Uncaria rhynchophylla* foi testada em modelos desta patologia. No teste *in vitro*, o extrato reduziu a morte celular, geração de ROS, aumentou os níveis de glutationa total e inibiu a atividade da caspase-3 induzida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA). No teste *in vivo*, em ratos, o pós-tratamento com

o extrato reduziu a rotação induzida por apomorfina e apresentou diminuição na perda neural dopaminérgica [108]. Shi e col, em 2013, investigaram os efeitos neuroprotetores de extratos aquosos da *U. tomentosa*, utilizando o modelo *Caenorhabditis elegans* e em células de neuroblastoma (SH-SY5Y). No teste *in vitro*, o extrato reduziu o dano celular causado por 6-OHDA. No teste *in vivo*, a agregação de α-sinucleína foi reduzida em animais tratados com 10 µg/ml de extrato. Estes estudos demonstram a possibilidade de uso do extrato de *U. tomentosa* na terapia contra a doença de Parkinson [109].

Nesse contexto, entre as possibilidades de atuação destas duas espécies de *Uncaria* sobre os processos inflamatórios, torna-se relevante avaliar seu efeito em um modelo experimental de neuroinflamação induzida por LPS. Buscando, dessa forma, contribuir para a busca de novas intervenções terapêuticas que possam auxiliar pessoas vítimas dessa enfermidade.

2 REFERÊNCIAS

1. Allen, N. J. & Lyons, D. A. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science* **362**, 181–185 (2018).
2. Salas, I. H., Burgado, J. & Allen, N. J. Glia: victims or villains of the aging brain? *Neurobiology of Disease* **143**, (2020).
3. Sood, A., Preeti, K., Fernandes, V., Khatri, D. K. & Singh, S. B. Glia: A major player in glutamate–GABA dysregulation-mediated neurodegeneration. *Journal of Neuroscience Research* **99**, 3148–3189 (2021).
4. Buffo, A. *et al.* Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 3581–3586 (2008).
5. Perea, G., Navarrete, M. & Araque, A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences* **32**, 421–431 (2009).
6. Greenhalgh, A. D., David, S. & Bennett, F. C. Immune cell regulation of glia during CNS injury and disease. *Nature Reviews Neuroscience* **21**, 139–152 (2020).
7. Giaume, C., Kirchhoff, F., Matute, C., Reichenbach, A. & Verkhratsky, A. Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death & Differentiation* **14**, 1324–1335 (2007).
8. Ibrahim, A. M., Pottoo, F. H., Dahiya, E. S., Khan, F. A. & Kumar, J. B. S. Neuron-glia interactions: Molecular basis of alzheimer's disease and applications of neuroproteomics. *European Journal of Neuroscience* **52**, 2931–2943 (2020).
9. Haroon, E., Miller, A. H. & Sanacora, G. Inflammation, Glutamate, and Glia: A Trio of Trouble in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology* **42**, 193 (2017).
10. Ajenikoko, M. K., Ajagbe, A. O., Onigbinde, O. A., Okesina, A. A. & Tijani, A. A. Review of Alzheimer's disease drugs and their relationship with

neuron-glia interaction. *IBRO Neuroscience Reports* **14**, 64–76 (2023).

11. Stogsdill, J. A. & Eroglu, C. The interplay between neurons and glia in synapse development and plasticity. *Current Opinion in Neurobiology* **42**, 1–8 (2017).
12. Tsybko, A. S., Ilchibaeva, T. V. & Popova, N. K. Role of glial cell line-derived neurotrophic factor in the pathogenesis and treatment of mood disorders. *Reviews in the Neurosciences* **28**, 219–233 (2017).
13. Mallucci, G., Peruzzotti-Jametti, L., Bernstock, J. D. & Pluchino, S. The role of immune cells, glia and neurons in white and gray matter pathology in multiple sclerosis. *Progress in Neurobiology* **127**–**128**, 1–22 (2015).
14. Sun, Y., Yu, H. & Guan, Y. Glia Connect Inflammation and Neurodegeneration in Multiple Sclerosis. *Neuroscience Bulletin 2023 39:3* **39**, 466–478 (2023).
15. Wang, Z. L., Yuan, L., Li, W. & Li, J. Y. Ferroptosis in Parkinson's disease: glia–neuron crosstalk. *Trends in Molecular Medicine* **28**, 258–269 (2022).
16. Gage, F. H. Adult neurogenesis in mammals. *Science* **364**, 827–828 (2019).
17. Baldwin, K. T. & Silver, D. L. Expanding gliogenesis. *Science* **372**, 1151–1152 (2021).
18. Li, J. *et al.* Astrocyte-to-astrocyte contact and a positive feedback loop of growth factor signaling regulate astrocyte maturation. *Glia* **67**, 1571–1597 (2019).
19. Araki, T., Ikegaya, Y. & Koyama, R. The effects of microglia- and astrocyte-derived factors on neurogenesis in health and disease. *The European Journal of Neuroscience* **54**, 5880 (2021).
20. Zhou, B., Zuo, Y. X. & Jiang, R. T. Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neuroscience & Therapeutics* **25**, 665–673 (2019).
21. Guillamón-Vivancos, T., Gómez-Pinedo, U. & Matías-Guiu, J. Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. *Neurología (English Edition)* **30**, 119–129 (2015).

22. Garwood, C. J. *et al.* Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role. *Neuropathology and Applied Neurobiology* **43**, 281–298 (2017).

23. Verkhratsky, A., Parpura, V., Pekna, M., Pekny, M. & Sofroniew, M. Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochemical Society Transactions* **42**, 1291–1301 (2014).

24. Liu, S., Yin, F., Zhang, J. & Qian, Y. The role of calpains in traumatic brain injury. *Brain Injury* **28**, 133–137 (2014).

25. Barzilai, A. The neuro-glial-vascular interrelations in genomic instability symptoms. *Mechanisms of Ageing and Development* **132**, 395–404 (2011).

26. Zorec, R. *et al.* Astroglial excitability and gliotransmission: An appraisal of Ca2+ as a signalling route. *ASN Neuro* **4**, 103–119 (2012).

27. Gutiérrez, Y. *et al.* Sibling astrocytes share preferential coupling via gap junctions. *GLIA* **67**, 1852–1858 (2019).

28. Sofroniew, M. V. & Vinters, H. V. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica* **119**, 7–35 (2010).

29. Sofroniew, M. V. Astrogliosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **7**, 1–16 (2015).

30. Messing, A. & Brenner, M. GFAP at 50. *ASN NEURO* **12**, (2020).

31. Santos, V. R., Melo, I. santana, Pacheco, A. L. D. & Castro, O. W. de. Life and death in the hippocampus: What's bad? *Epilepsy & Behavior* **121**, 106595 (2021).

32. Mark F. Bear, Barry W. Connors & Michael A. Paradiso. *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*. (2017).

33. Freitas Barbosa, F., Maria De Oliveira Pontes, I., Ribeiro, S., Ribeiro, A. M. & Silva, R. H. Differential roles of the dorsal hippocampal regions in the acquisition of spatial and temporal aspects of episodic-like memory. *Behavioural Brain Research* **232**, 269–277 (2012).

34. Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S. & Moser, E. I. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews*

Neuroscience **15**, 655–669 (2014).

35. Cryan, J. F. & Holmes, A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nature Reviews Drug Discovery* **4**, 775–790 (2005).

36. Domínguez-Rivas, E., Ávila-Muñoz, E., Schwarzacher, S. W. & Zepeda, A. Adult hippocampal neurogenesis in the context of lipopolysaccharide-induced neuroinflammation: A molecular, cellular and behavioral review. *Brain, Behavior, and Immunity* **97**, 286–302 (2021).

37. Duan, W. *et al.* Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator. *Molecular Neurobiology* **53**, 1637–1647 (2016).

38. Gusel'nikova, V. V & Korzhevskiy, D. E. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta naturae* **7**, 42–47 (2015).

39. Madrid, L. I., Jimenez-Martin, J., Coulson, E. J. & Jhaveri, D. J. Cholinergic regulation of adult hippocampal neurogenesis and hippocampus-dependent functions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **134**, 105969 (2021).

40. Ramachandran, A. K. *et al.* Neurodegenerative Pathways in Alzheimer's Disease: A Review. *Current Neuropharmacology* **19**, 679–692 (2020).

41. Shen, X., Luis Venero, J., Joseph, B., Burguillos, M. A. & Burguillos, M. A. Caspases orchestrate microglia instrumental functions. *Progress in Neurobiology* **171**, 50–71 (2018).

42. Louneva, N. *et al.* Caspase-3 is enriched in postsynaptic densities and increased in Alzheimer's disease. *American Journal of Pathology* **173**, 1488–1495 (2008).

43. Avchalumov, Y. & Mandyam, C. D. Plasticity in the Hippocampus, Neurogenesis and Drugs of Abuse. *Brain Sciences* **11**, (2021).

44. Chen, W. W., Zhang, X. & Huang, W. J. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (review). *Molecular Medicine Reports* **13**, 3391–3397 (2016).

45. Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A. & Mohan, G. Neuroinflammation pathways: a general review. *International Journal of Neuroscience* **127**, 624–633 (2017).

46. Leng, F. & Edison, P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nature Reviews Neurology* **17**, 157–172 (2021).

47. Arena, G. *et al.* Neurodegeneration and Neuroinflammation in Parkinson's Disease: a Self-Sustained Loop. *Current Neurology and Neuroscience Reports* **22**, 427–440 (2022).

48. Shi, F. D. Neuroinflammation. *Neuroscience Bulletin* **31**, 714–716 (2015).

49. Schain, M. & Kreisl, W. C. Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders—a Review. *Current Neurology and Neuroscience Reports* **17**, (2017).

50. Piotrowska, K. *et al.* Over-Expression of Allograft Inflammatory Factor-1 (AIF-1) in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Biomolecules* **10**, 1064 (2020).

51. Sandoval, M. *et al.* Cat's claw inhibits TNFα production and scavenges free radicals: role in cytoprotection. *Free Radical Biology and Medicine* **29**, 71–78 (2000).

52. Montserrat-De La Paz, S. *et al.* Mitraphylline inhibits lipopolysaccharide-mediated activation of primary human neutrophils. *Phytomedicine* **23**, 141–148 (2016).

53. Rostami, F., Oryan, S., Ahmadiani, A. & Dargahi, L. Morphine Preconditioning Protects Against LPS-Induced Neuroinflammation and Memory Deficit. *Journal of Molecular Neuroscience* **48**, 22–34 (2012).

54. Singh, S., Sahu, K., Singh, C. & Singh, A. Lipopolysaccharide induced altered signaling pathways in various neurological disorders. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **395**, 285–294 (2022).

55. Nava Catorce, M. & Gevorkian, G. LPS-induced Murine Neuroinflammation Model: Main Features and Suitability for Pre-clinical Assessment of Nutraceuticals. *Current Neuropharmacology* **14**, 155–164 (2016).

56. Zakaria, R. *et al.* Lipopolysaccharide-induced memory impairment in rats: A model of Alzheimer's disease. *Physiological Research* **66**, 553–565 (2017).

57. Guerra, M. C. *et al.* Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: A study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *Journal of Neuroinflammation* **8**, 128 (2011).

58. Ciesielska, A., Matyjek, M. & Kwiatkowska, K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences 2020 78:4* **78**, 1233–1261 (2020).

59. Zhao, J. *et al.* Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Scientific Reports* **9**, 1–12 (2019).

60. Wang, X. & Quinn, P. J. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Progress in Lipid Research* **49**, 97–107 (2010).

61. Deng, I., Corrigan, F., Zhai, G., Zhou, X. F. & Bobrovskaya, L. Lipopolysaccharide animal models of Parkinson's disease: Recent progress and relevance to clinical disease. *Brain, Behavior, and Immunity - Health* **4**, 100060 (2020).

62. Becker, M., Pinhasov, A. & Ornoy, A. Animal Models of Depression: What Can They Teach Us about the Human Disease? *Diagnostics* **11**, 123 (2021).

63. Mehrhoff, E. A. *et al.* Diazepam effects on anxiety-related defensive behavior of male and female high and low open-field activity inbred mouse strains. *Physiology & Behavior* **271**, 114343 (2023).

64. Pacheco, S. M. *et al.* Anthocyanins as a potential pharmacological agent to manage memory deficit, oxidative stress and alterations in ion pump activity induced by experimental sporadic dementia of Alzheimer's type. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **56**, 193–204 (2018).

65. Cognato, G. P. *et al.* Caffeine and an adenosine A2A receptor antagonist prevent memory impairment and synaptotoxicity in adult rats triggered by a convulsive episode in early life. *Journal of Neurochemistry* **112**, 453–462 (2010).

66. Yepes-Pérez, A. F., Herrera-Calderon, O. & Quintero-Saumeth, J. Uncaria tomentosa (cat's claw): a promising herbal medicine against SARS-CoV-2/ACE-2 junction and SARS-CoV-2 spike protein based on molecular modeling. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **0**,

1–17 (2020).

67. Ministério da Saúde, B. Lei nº 8080 : 30 anos de criação do Sistema Único de Saúde (SUS). *Biblioteca Virtual em Saúde* 1–3 https://bvsms.saude.gov.br/lei-n-8080-30-anos-de-criacao-do-sistema-unico-de-saude-sus/ (2020).

68. Ministério da Saúde, B. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 190 http://editora.saude.gov.br (2016).

69. Marmitt, D. J., Rempel, C., Goettert, M. I. & Silva, A. C. Plantas medicinais da RENISUS com potencial anti-inflamatório: revisão sistemática em três bases de dados científicas. *Revista Fitos* **9**, 129–144 (2015).

70. Rezende, M. & Oliveira, A. C. Análise da qualidade técnica da redação de pedidos de patentes de fitoterápicos de interesse ao SUS. *Revista Fitos* **13**, 126–141 (2019).

71. Ministério da Saúde, B. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais Rename 2022. 181 http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao_nacional_medicamentos_2022.pdf ISBN (2022).

72. Ministério da Saúde, B. Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – Renisus — Português (Brasil). https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sctie/daf/pnpmf/ppnpmf/plantas-medicinais-de-interesse-ao-sus-2013-renisus (2022).

73. Liang, J. H. *et al.* The genus Uncaria: A review on phytochemical metabolites and biological aspects. *Fitoterapia* **147**, 104772 (2020).

74. Laus, G., Brössner, D. & Keplinger, K. Alkaloids of peruvian Uncaria tomentosa. *Phytochemistry* **45**, 855–860 (1997).

75. Nowakowska, J., Sommer, E., Czubaj, A., Kuraś, M. & Skopińska-Rózewska, E. The effect of Uncaria tomentosa bark water extract on chemokinetic activity of spleen lymphocytes in mice. *Central-European Journal of Immunology* **34**, 235–238 (2009).

76. Keplinger, K., Laus, G., Wurm, M., Dierich, M. P. & Teppner, H. Uncaria tomentosa (Willd.) DC.—Ethnomedicinal use and new pharmacological,

toxicological and botanical results. *Journal of Ethnopharmacology* **64**, 23–34 (1998).

77. Honório, I. C. G., Bertoni, B. W. & Pereira, A. M. S. Uncaria tomentosa and Uncaria guianensis an agronomic history to be written. *Ciência Rural* **46**, 1401–1410 (2016).

78. Valente, L. M. M. Unha-de-gato [Uncaria tomentosa (Willd.) DC. e Uncaria guianensis (Aubl.) Gmel.]: Um Panorama Sobre seus Aspectos mais Relevantes. *Fitos* **2**, 48–58 (2006).

79. Snow, A. D. *et al.* The Amazon rain forest plant Uncaria tomentosa (cat's claw) and its specific proanthocyanidin constituents are potent inhibitors and reducers of both brain plaques and tangles. *Scientific Reports* **9**, 561 (2019).

80. Valdiviezo-Campos, J. E., Blanco-Olano, C., Olascuaga-Castillo, K. & Rubio-Guevara, S. Uncaria tomentosa (Willd.) DC. (Rubiaceae): Especie nativa del Perú, medicamento herbolario reconocido por la medicina tradicional. *Ethnobotany Research and Applications* **19**, (2020).

81. Gonzales, G. & Valerio, L. Medicinal Plants from Peru: A Review of Plants as Potential Agents Against Cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **6**, 429–444 (2008).

82. Pinto, G. H. T. *et al.* Genetic diversity among genotypes of Uncaria guianensis (Aubl.) J.F. Gmel. maintained in an in vitro germplasm bank. *3 Biotech* **12**, 10 (2021).

83. Honório, I. C. G. *et al.* Genetic structure and chemical diversity in natural populations of Uncaria guianensis (Aubl.) J.F.Gmel. (Rubiaceae). *PLOS ONE* **13**, e0205667 (2018).

84. Blanck, J. J., Huebner, T. M., Rolls, A. M., Cornell, J. S. & Hwang, C. S. Comprehensive Review of the Components in Cat's Claw (Uncaria tomentosa) and Their Antibacterial Activity. *AppliedChem* **2**, 1–29 (2022).

85. Bieski, I. G. C. Unha-de-gato. 14 https://www.ppmac.org/sites/default/files/unha_de_gato.pdf (2005).

86. Zhang, Q., Zhao, J. J., Xu, J., Feng, F. & Qu, W. Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the genus Uncaria. *Journal of*

Ethnopharmacology **173**, 48–80 (2015).

87. Batiha, G. E. S. *et al.* Uncaria tomentosa (Willd. ex Schult.) DC.: A review on chemical constituents and biological activities. *Applied Sciences (Switzerland)* **10**, 1–12 (2020).

88. Heitzman, M. E., Neto, C. C., Winiarz, E., Vaisberg, A. J. & Hammond, G. B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of Uncaria (Rubiaceae). *Phytochemistry* **66**, 5–29 (2005).

89. Ferreira Rodrigues Sarquis, R. D. S. *et al.* The Use of Medicinal Plants in the Riverside Community of the Mazagão River in the Brazilian Amazon, Amapá, Brazil: Ethnobotanical and Ethnopharmacological Studies. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM* **2019**, 25 (2019).

90. De Martino, L. *et al.* Proapoptotic effect of Uncaria tomentosa extracts. *Journal of Ethnopharmacology* **107**, 91–94 (2006).

91. Santos, K. F. *et al.* Uncaria tomentosa extract alters the catabolism of adenine nucleotides and expression of ecto-5′-nucleotidase/CD73 and P2X7 and A1 receptors in the MDA-MB-231 cell line. *Journal of Ethnopharmacology* **194**, 108–116 (2016).

92. Sandoval, M. *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (Uncaria tomentosa and Uncaria guianensis) are independent of their alkaloid content. *Phytomedicine* **9**, 325–337 (2002).

93. Urdanibia, I., Michelangeli, F., Ruiz, M.-C., Milano, B. & Taylor, P. Anti-inflammatory and antitumoural effects of Uncaria guianensis bark. *Journal of Ethnopharmacology* **150**, 1154–1162 (2013).

94. Xu, Q. Q. *et al.* Comparison of the chemical constituents and anti-Alzheimer's disease effects of Uncaria rhynchophylla and Uncaria tomentosa. *Chinese Medicine (United Kingdom)* **16**, 1–15 (2021).

95. Castilhos, L. G. *et al.* Effect of Uncaria tomentosa extract on purinergic enzyme activities in lymphocytes of rats submitted to experimental adjuvant arthritis model. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **15**, 189 (2015).

96. Phillipson, J. D., Hemingway, S. R. & Ridsdale, C. E. *Alkaloids of Uncaria.*

Part V. Their occurrence and chemotaxonomy. vol. 41 (1978).

97. Aquino, R., De Feo, V., De Simone, F., Pizza, C. & Cirino, G. Plant Metabolites. New Compounds and Anti-Inflammatory Activity of Uncaria tomentosa. *Journal of Natural Products* **54**, 453–459 (1991).

98. Yepes-Pérez, A. F. *et al.* Investigating Potential Inhibitory Effect of Uncaria tomentosa (Cat's Claw) against the Main Protease 3CLpro of SARS-CoV-2 by Molecular Modeling. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2020**, 1–14 (2020).

99. Carvalho, M. V., Penido, C., Siani, A. C., Valente, L. M. M. & Henriques, M. G. M. O. Investigations on the anti-inflammatory and anti-allergic activities of the leaves of Uncaria guianensis (Aublet) J. F. Gmelin. *Inflammopharmacology* **14**, 48–56 (2006).

100. Hernandes, C. *et al.* The Effect of Rutin and Extracts of Uncaria guianensis (Aubl.) J. F. Gmeland on Primary Endometriotic Cells: A 2D and 3D Study. *Molecules* **25**, (2020).

101. Valente, L. M. M. *et al.* Kaempferitrin from Uncaria guianensis (Rubiaceae) and its potential as a chemical marker for the species. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **20**, 1041–1045 (2009).

102. da Paixão, D. *et al.* Polyphenol Profile and Quantitative Assessment of the Flavonoid Kaempferitrin in Wild and Cultivated Brazilian Amazonian Uncaria guianensis (Rubiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* **32**, 1670–1679 (2021).

103. García Prado, E., García Gimenez, M. D., De la Puerta Vázquez, R., Espartero Sánchez, J. L. & Sáenz Rodríguez, M. T. Antiproliferative effects of mitraphylline, a pentacyclic oxindole alkaloid of Uncaria tomentosa on human glioma and neuroblastoma cell lines. *Phytomedicine* **14**, 280–284 (2007).

104. Rizzi, R. *et al.* Mutagenic and antimutagenic activities of Uncaria tomentosa and its extracts. *Journal of Ethnopharmacology* **38**, 63–77 (1993).

105. Angeloni, C. & Vauzour, D. Natural products and neuroprotection. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 1–5 (2019).

106. Iwai, T., Iinuma, Y., Kodani, R. & Oka, J. I. Neuromedin U inhibits inflammation-mediated memory impairment and neuronal cell-death in rodents. *Neuroscience Research* **61**, 113–119 (2008).

107. Castilhos, L. G. *et al.* Uncaria tomentosa improves cognition, memory and learning in middle-aged rats. *Experimental Gerontology* **138**, 111016 (2020).

108. Shim, J. S. *et al.* Effects of the hook of Uncaria rhynchophylla on neurotoxicity in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Journal of Ethnopharmacology* **126**, 361–365 (2009).

109. Shi, Z. *et al.* Neuroprotective effects of aqueous extracts of Uncaria tomentosa: Insights from 6-OHDA induced cell damage and transgenic Caenorhabditis elegans model. *Neurochemistry International* **62**, 940–947 (2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo desta dissertação foi avaliar os efeitos neuroprotetores do extrato seco da Unha de Gato (*Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*) sobre a memória, perda de neurônios e reatividade glial no hipocampo de ratos após neuroinflamação crônica recorrente.

3.2 Objetivos específicos

Em animais tratados com extratos de unha de gato (30 e 100 mg/kg, gavagem) e Lipopolissacarídeo (LPS, i.p), foram avaliados:

- Os parâmetros comportamentais de locomoção, bem como de memória de curta e longa duração;
- Marcadores de apoptose (Caspase-3) e de neurônios maduros (NeuN);
- Marcador astrocitário: proteína ácida fibrilar glial (GFAP); e
- Marcador microglial: Iba1.

4 ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

Uña de gato bark dry extract reduces memory impairment, glial reactivity and neuronal loss after chronic-recurrent neuroinflammation in rats

Gabrielle N. da Silva[a], Jessié M. Gutierres[b*], Fernanda Huf[a], Adriana M. Zago[a], Anemarí G. de Azevedo[a], Luiz Felipe C. Koenig[a], Renan F.M. Torres[a], Lais Pereira Lopes [a], Carolina Büttenbender [a], Augusto V. Pessi[a], Fábio S. Barbosa[b], Sarah Eller [b], Giuliano Rizzotto Guimarães[a], Tiago F. de Oliveira[b], Marilda C. Fernandes[a*].

[a] *Graduate Program in Pathology, Pathology Research Laboratory, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil*

[b] *Graduate Program in Health Science, Analytical Toxicology Laboratory, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil*

[*] *Corresponding Author:*

Marilda da Cruz Fernandes

Health Sciences Department, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Sarmento Leite, 245, Room 514 - Building 3. CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil. *E-mail address:* marneuro@ufcspa.edu.br

Jessié Martins Gutierres

Pathology Research Laboratory, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Sarmento Leite, 245, Room 514 - Building 3. CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil. *E-mail address:* jessiegutierres@gmail.com

ORCID number:

Gabrielle N. da Silva: Orcid - 0000-0001-7950-6028.

Jessié M. Gutierres: Orcid - 0000-0002-9574-4007.

Fernanda Huf: Orcid - 0000-0002-4929-5626.

Adriana M. Zago: Orcid - 0000-0002-6866-946X.

Anemarí Girardon de Azevedo: Orcid - 0000-0002-3526-6189.

Luiz Felipe Carvalho Koenig: Orcid - 0000-0002-5574-4707.

Renan Franke Montenegro Torres: Orcid – 0000-0003-2056-4551.

Augusto Pessi: Orcid – 0009-0009-8972-2758.

Lais Pereira Lopes - 0009-0006-5360-7895

Carolina Büttenbender - 0000-0002-0766-8025

Fabio S Barbosa: Orcid - 0000-0001-6796-1437

Sarah Eller: Orcid - 0000-0003-2200-6959

Giuliano Rizzotto Guimarães: Orcid - 0000-0001-6961-5837

Tiago Franco de Oliveira: Orcid - 0000-0003-2594-8415.

Marilda da Cruz Fernandes: Orcid - 0000-0003-4234-797X.

Highlights

- Uña de Gato improves short-term and long-term recognition memory in CRN animals;
- Uña de Gato improves spatial memory in CRN animals;
- Uña de Gato protects mature neurons in the hippocampus of CRN animals;
- Uña de Gato reduced astrogliosis in the hippocampus of CRN animals;

ABSTRACT

The goal of this study was to find out how Uña de gato extract (UG, 30 and 100 mg/kg) treatment affects learning and memory problems, mature neurons, cell death, and glial activation induced by chronic recurrent neuroinflammation (CRN), as well as the molecular mechanisms that are probably at play.

Twenty adult male Wistar rats were split into four groups: the vehicle group (VE), the LPS group (LPS), the LPS + UG30 mg/kg group (LPS + UG30), and the LPS + UG100 mg/kg group (LPS + UG100). For 34 days, the LPS group received UG by gavage, and the UG+UG30 group received UG+UG100.The immunohistochemistry technique was employed to detect caspase-3, NeuN, Iba1, and GFAP in sections of the dentate gyrus of the hippocampus of these animals. Quantification was performed by optical densitometry (OD). The results showed that (1) chronic injection of lipopolysaccharides (LPS) (i.p) resulted in a significant decline in the index of short- and long-term episodic

memory (object recognition task) and spatial learning and memory (Y-maze task) of rats; (2) treatment with both doses of UG effectively protected against learning and memory impairment induced by CRN; (3) Treatment with UG significantly decreased the expression of glial fibrillary acid protein (GFAP) in the hippocampal dentate gyrus (GD), both doses, and in *cornu Ammonis* area 1 (CA1), at the UG100 dose; and increased the neuronal nuclear protein (NeuN) expression in hippocampal DG, CA1, and *cornu Ammonis* area 3 (CA3) of CRN, and the underlying protective mechanism of UG may be involved in the influence of astrocytes on neuronal survival. On the other hand, the results show that systemic treatment with UG fails to effectively prevent CRN-induced increased expression of Iba-1 and cleaved caspase-3. Thus, the application of UG at a dose of 100 mg/kg exerts protective effects on memory, adult neurons, and astrocytes but not enough to reverse the effects of microglial activation or cell death induced by chronic neuroinflammation.

Keywords: *Uña de gato*, neuroinflammation, memory, neurons, astrocytes, lipopolysaccharides.

INTRODUCTION

The genus *Uncaria*, which belongs to the Rubiaceae family, comprises several species of woody vines found in tropical and subtropical regions worldwide. Two species in particular are found in the Amazon rainforest and other parts of South America: *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. and *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC, also known as cat's claw, "unha-de-gato" or "*Uña de gato*" [1]. *Uncaria guianensis* has traditionally been used by Indigenous populations to treat various diseases, including arthritis, inflammation, and cancer [2]. Studies have also suggested that extracts from *U. guianensis* possess antimicrobial [3] and anti-inflammatory properties [2], which could have potential therapeutic applications in various conditions. Similarly, *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC, like *U. guianensis*, has a long history of traditional use in treating a range of health conditions, including arthritis, viral infections, and stomach [4].

Recent research has also highlighted its potential as a neuroprotective agent, with evidence suggesting that *U. tomentosa* extracts could help to prevent or slow the progression of neurodegenerative diseases [5]. Both *U. guianensis* and *U. tomentosa* contain a range of bioactive compounds, including alkaloids and flavonoids, which have been shown to possess a range of pharmacological properties [6]. These compounds have been studied extensively for their potential to modulate immune function, reduce inflammation, and protect against oxidative stress [7]. In addition, it has been reported that *U. tomentosa* extract can improve cognitive function and memory, making it potentially helpful in treating neurological disorders [8].

Evidence suggests dysfunction in neuron-glia communication may play a crucial role in neurodegenerative processes [9,10]. Glia is a highly active participant in the neuronal network, capable of releasing gliotransmitters and possessing many of the same receptors as neurons. This suggests that glia and neurons can communicate using the same chemical language [11,12].The glial fibrillary acidic protein (GFAP) network is highly plastic and changes in response to stimuli and injury, as observed in acute and reactive astrocytosis, and astrogliosis [13]. In the process of neuroinflammation, there is an upregulation of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin 1 beta (IL-1β),

IL-6, IL-18, tumor necrosis factor (TNF), chemokines CC and CXC, prostaglandins, nitric oxide, and reactive oxygen species, which are released by glial cells. Microglia and astrocytes play a pivotal role in this process [14,15].

Many natural alkaloid compounds have been shown to have important cognitive effects, such as berberine [4], levo-tetrahydropalmatine (l-THP) [16], protopine (PRO) [17], and isorhynchophylline (IRN) [18] which improve rodent memory in behavioral tasks. Previous studies have demonstrated the potential for memory improvement in rats treated with *U. tomentosa* in the Morris water maze [5,19]. Neurodegenerative diseases are often characterized by neuronal loss and intense neuroinflammation [20], and for the evaluation of postmitotic neurons, NeuN is commonly used as a marker [21]. Neuronal death is accompanied by marked apoptosis, and abnormal expression levels of caspase-3 have been found in post-mortem tissues of patients with Alzheimer's disease [22].

In this background, we aimed to assess the potential effects of the hydroalcoholic extract of *Uña de gato* (UG) on i) spatial and recognition memory in animals subjected to an acute and chronic recurrent neuroinflammation model (CRN), ii) neuronal loss and the expression of caspase-3 in the hippocampus of these animals and iii) regulation of glial reactivity, including expression of GFAP in astrocytes and ionized calcium-binding adaptor protein-1 (Iba-1) in microglia, in the hippocampus of rats.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Sodium citrate, albumin, paraformaldehyde, and DAPI dihydrochloride were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the detailed experiments were of analytical grade and the highest purity.

Animals

Twenty adult male Wistar rats (60 days, 250–300 g) were provided by the Central Animal House of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre. The animals were kept in cages under standard temperature (23 ± 1 °C), relative humidity (45–55%), and lighting conditions (12 h light/dark cycle) and with free access to standard rodent pelleted diet and water *ad libitum*. This study was conducted under the policies stipulated in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH) from the Committee of Ethics and Animal Experimentation of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Brazil, under protocol number CEUA 280/20, approved all animal procedures. The use of animals was in accordance with the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Scientific Research Activities (DBCA), which agrees with the National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA).

Collection and Preparation of the Extract

The hydroalcoholic extract of *Uña de gato* was obtained by Florien Fitoativos LTDA. The barks of *Uña de gato* were obtained in Brazil, the processing of the barks of *U. tomentosa* and *U. guianensis* from lot number NPT.0820/762 took place in the processing laboratory of Florien Fitoativos LTDA in the city of Piracicaba, state of São Paulo, Brazil.

HPLC Sample Preparation

To extract the compounds, 50 mg of the lyophilized material was dissolved in 2000 µL of a NaOH solution (1 mol L^{-1}). The sample was vortexed for 30 seconds and then 1500 µL of the switchable hydrophilicity solvent N,N-dimethylcyclohexylamine (DMCHA) was added. The mixture was centrifuged at 9,000 rpm for 10 minutes, the entire supernatant was collected, dried under nitrogen flow, and reconstituted in 50 µL of methanol. 20 µL aliquots of the concentrated extract were injected into a liquid chromatography system, model UFLCXR (Shimadzu, Japan) coupled to a hybrid system with quadrupole and TOF (time-of-flight) analyzers in an orthogonal position, model microOTOF-QIII (Bruker Daltonics, USA).

Uña de gato Treatment

The animals treated by gavage with *Uña de gato* extract for 34 days, once a day at a dose of 30 mg/kg (UG30) or 100 mg/kg (UG100), both dissolved in distilled water. The control group received vehicle (distilled water) orally and saline solution intraperitoneally (ip). Lipopolysaccharide (LPS) injections were administered intraperitoneally at a dose of 250 µg/kg, once every 5 days for a total of five administrations over the 34-day period [23]. The solutions of UG and LPS were administered at a volume of 2 mL/kg orally and 1 mL/kg i.p respectively. The animals were divided into four experimental groups with 5 rats each: I, vehicle (VE); II, LPS 250 µg/kg (LPS); III, LPS *plus Uña de gato* 30 mg/kg (LPS+UG30); and IV, LPS *plus Uña de gato* 100 mg/kg (LPS+UG100). The body weight of the animals was evaluated weekly during the experiment. The dose of *Uña de gato* was chosen based on previous studies that indicated its neuroprotective effects [19,24].

Behavioral evaluation

Open-field test (OF)

The locomotor behavioral tests were performed using an open-field apparatus, following the protocol described by [25]. The apparatus consisted of a box with the floor divided into 16 equal squares (18 × 18 cm) and was placed in a soundproof room. Each animal was placed in the center of the arena and allowed to explore freely for 5 minutes. The behavior was recorded with a camera positioned above the arena, and the videos were analyzed using the OpenFLD v1.0 software, which allowed us to count the number of squares crossed, the number of rearings, and the length of stay in the center and periphery. This test was performed to identify any motor disabilities that could affect the interpretation of the results from the other behavioral tests. After each individual rat session, the apparatus was cleaned with a 30% alcohol solution and dried.

Y-maze test (YM)

Spatial recognition memory was assessed using an apparatus consisting of three arms: the start arm (always open), the novel arm (blocked during training but open during the test session), and the other arm (always open). During the training session, the rat was placed in the start arm and allowed to explore only the start arm and the other arm for 5 minutes, while the novel arm remained blocked. After a 4-hour, the test session was conducted with the novel arm open, and the rat could explore all three arms freely for 5 minutes. The apparatus was cleaned with 30% ethanol after each session. All sessions were recorded and later analyzed using PlusMaze v1.1 - 10/7 software to determine the time spent and number of entries on each arm. The results were expressed as the time spent and number of entries on each arm [25].

Object Recognition Test (OR)

The object recognition test (OR) was used to evaluate declarative memory in rodents, which is based on their natural tendency to explore a new object more than a familiar one, in a familiar environment [26]. The task consisted of three sessions: habituation (without the presence of objects), training, and test. The object recognition test was conducted 24 hours after the open field test, which was considered as habituation. In the training session, the animals were placed for 5 minutes in the presence of two identical objects (objects A1 and A2) positioned on two adjacent sides. Exploration time was recorded when the animal touched its nose or came close to the object (within a distance of less than 2 cm). Treatment with the vehicle (saline) and *Uña de gato* (UG30 and UG100) was administered 1 hour before training and immediately after training. The test session was conducted 4 hours (short-term memory - STM) and 24 hours (long-term memory - LTM) after training, during which the rats were left for 5 minutes to explore the objects, and one of the familiar objects used during training was replaced with a new object (object A, B-4h, or C-24h). All objects were made of odorless plastic and were of similar size, but with different colors and shapes for each test. Objects and the testing environment were cleaned with 30% ethanol solution. The sessions were recorded, and the total time spent exploring each object with the nose and/or

forepaws was recorded and later analyzed using PlusMaze v1.1 software. Recognition memory was evaluated using a discrimination index (%), which was calculated as the difference between the time spent exploring the new object (B or C) and the familiar object (A) multiplied by 100, and divided by the sum of the time spent exploring the new object (B or C) and the familiar object (A): [(new T.B or C – familiar T.A) / (new T.B or C + familiar T.A)] / 100 [25]. INDEX: [(t. novel – t. familiar) ÷ (t. novel + t. familiar)]/100. The summarized procedures are in Figure 1A.

Immunohistochemistry Assays

On day 35, the animals were deeply anesthetized with an i.p. injection of ketamine (80 mg/kg; Syntech) and xylazine (5 mg/kg; Syntech 2%) and transcardially perfused with saline 0.9% (during 10 min) and 4% paraformaldehyde (PFA, during 30 min) in 1% phosphate-buffered saline (PBS at pH 7.4). The brains were postfixed in 4% PFA (24 hours), transferred to a solution of 30% sucrose in PBS-1% until total submersion (Silva et al., 2021). Then, the frozen fixed brains were sectioned (5 and 16 µm coronal sections) using a cryostat Leica CM3050S (Leica Microsystem, German). Next, the sections were mounted on slides coated with 2% gelatin plus 0.08% chromium and potassium sulfate, from Sigma-Aldrich, Brazil) and finally allowed to dry at room temperature for 24 hours. At last, all sections were stored at -20°C until use.

Immunofluorescence Analysis

Firstly, the samples, still frozen, were washed with cold acetone for 10 minutes, under agitation. Then, the acetone was allowed to evaporate. The sections were washed in PBS twice (10 min) and blocked/permeabilized with 5% bovine serum albumin (BSA) and PBS plus 0.1% Triton X-100 for 2 hours at room temperature (RT). Sections were incubated with primary antibodies diluted in 5% BSA solution: Rabbit anti-Iba1 (sections of 16 µm, microglia marker, Abcam Cod. GTX100042) 1:400, overnight at 4°C, followed by secondary antibody (goat anti-rabbit alexa 555, 1:1,000, 2 hr RT in the dark,

ThermoFischer cod. A21429); Rabbit anti-GFAP (sections of 16 µm, astrocyte marker, Sigma Aldrich cod. G9269) 1:800, overnight at 4°C, followed by secondary antibody (goat anti-rabbit alexa 555, 1:1,000, 2 hr RT in the dark, ThermoFischer cod. A21429); Mouse anti-NeuN (sections of 5 µm, mature neuronal marker, MilliPore cod MAB377) 1:2,000, overnight at 4°C, followed by secondary antibody (goat anti-mouse alexa fluor 488, 1:500, 2 hr, RT in the dark, Thermo Fischer cod. A11001); Rabbit anti-CASPASE (sections of 5 µm, cell death marker, Cell Signaling Technology cod. D175) 1:400, overnight at 4°C, followed by secondary antibody (goat anti-rabbit alexa 594, 1:500, 2 hr RT in the dark, ThermoFischer cod. A21429). The DAPI dihydrochloride solution (1 µg/ml, sigma Aldrich cod D9542) was prepared in PBS-Tx, and an incubation was carried out for 10 minutes in the dark. Then, the sections were washed 4 times with PBS-Tx for 5 minutes each. Vecta-Shield was added over the sections which were then overlaid with a coverslip. The images were acquired using a Leica DM6-B microscope, Leica DFC 7000-T camera and Leica Las X software. A total of 3 sections were used for each rat. For each section, 6 images were acquired on the regions of hippocampus (CA1, CA3 and DG). The slides were evaluated in a wide-field optical microscope for fluorescence observations (Leica DM6000 B) and the images obtained were captured by a camera (Leica DFC7000 T) attached to the microscope. The images were analyzed using the Leica LAS X and Image Pro-Plus 6.3 software to perform the counting and densitometry of cells labeled with the aforementioned antibodies.

Statistical Analysis

The normality of the samples was analyzed using the Anderson-Darling, D`Agostinho & Pearson and Kolmogorov-Smirnov test. For the OF test results, non-parametric statistics were performed using the Kruskal-Wallis test and expressed as median and interquartile range. The data for YM, RO and immunofluorescence were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) and means were compared using Tukey's post hoc test using the GraphPad Prism version 5.0 software (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, USA). Statistical significance was considered at $P \leq 0.05$. The data were presented as mean ± standard error of the mean (SEM).

RESULTS

Chemical Composition of *Uña de gato* Bark Extract: HPLC Analysis Reveals Active Alkaloid Content and Identification of Multiple Compounds

The result of HPLC analysis of dry *Uña de gato* bark extract used in this study is presented in Table 1. The extract has an active alkaloid content of 5%. Five pentacyclic alkaloids were identified, which may be Uncarin A, mitraphylline, Uncarina F, isomitraphylline, and isopteropodin. Also detected are 2 tetracyclic alkaloides, in addition to angustine, epicatechin, ajmalicine, 3-isoamalicin, kaempferitrin, and chlorogenic acid. Other compounds were detected, but not identified (Table 2).

Effects of treatment with UG and LPS on behavior in the open field task

During the open field task, we evaluated the time spent by the subjects in the center (Figure 1.B) and periphery (Figure 1.C) of the apparatus. However, no significant differences were observed between the groups when measuring the time spent in both regions of the device. As for the evaluation of animal behavior in terms of mobility, we analyzed the number of crossings between the squares of the apparatus and no significant differences were observed between groups in terms of crossing rate (Figure 1.D). To assess exploratory behavior in the open field task, we analyzed the number of times the animals stood on their hind legs, known as rearing, and there was also no3 significant difference between the groups in terms of rearing (Figure 1.E).

UG treatment shows protective effects on memory impairment caused by LPS injection in rats

In Figure 1.F-G, the index values for short-term and long-term recognition memory index (4 and 24 hours after training) in 34 days of treatment with UG. Evaluating the INDEX STM, One-way ANOVA indicated a significant decrease in the short-term memory index in the LPS group (23.95 ± 4.5 SEM) compared to the VE (50.22 ± 2.22 SEM, $P \leq 0.0001$) and a protective effect in the LPS+UG30 (41.95 ± 3.6 SEM, $P \leq 0.003$). It was also observed that despite One-way ANOVA indicated a protective effect in the in the STM index in the

compared to the LPS (23.95 ± 4.5 SEM, $P \leq 0.05$), the LPS+UG100 group (36.68 ± 1.4 SEM) is significantly lower in relation to the VE (50.22 ± 2.2 SEM, $P \leq 0.01$) (Figure 1.F). One-way ANOVA indicated a significant increased in the LTM index in the VE (76.86 ± 3.3 SEM, $P \leq 0.02$) and a protective effect in the LPS+UG30 (83.42 ± 2.3 SEM, $P \leq 0.001$) and LPS+UG100 (81.62 ± 2.7 SEM, $P \leq 0.002$) groups when compared to the LPS group (56.63 ± 8.9 SEM) (Figure 1.G).

UG treatment improves spatial memory in LPS-induced cognitive impairment in Y-maze task

With respect to spatial memory using Y-maze task (Figure 1. H-I), we observed a significant decrease in the number of entries in the novel arm in the LPS group (6.7 ± 0.4 SEM) when compared to the VE (8.5 ± 0.4 SEM, $P \leq 0.03$), LPS+ UG30 (9.1 ± 0.3 SEM, $P \leq 0.002$) and LPS+UG100 (8.7 ± 0.5 SEM, $P \leq 0.02$), groups (Figure 1.H). In the time spent in the novel arm, we observed a significant decrease in the time spent in the novel arm in the LPS group (6.7 ± 0.4 SEM) when compared to the VE (8.5 ± 0.4 SEM, $P \leq 0.004$), LPS+UG30 (9.1 ± 0.3 SEM, $P \leq 0.0002$), and LPS+UG100 (8.7 ± 0.5 SEM, $P < 0.0001$) groups (Figure 1.I).

Increased Immunoreactivity for NeuN Cells in the Hippocampus of Rats Subjected to Neuroinflammation and Treated with UG

Figure 2.A depicts the immunoreactivity for NeuN, a useful marker of postmitotic neurons, in the dentate gyrus (DG), CA1, and CA3 regions of the hippocampus in rats subjected to chronic-recurrent neuroinflammation induced by LPS and treated with UG. Regarding NeuN immunoreactivity in the DG of the hippocampus (Figure 2.B), we observed an increased immunoreactivity for NeuN cells in the group LPS+UG100 (1.0 ± 0.03 SEM) when compared to the groups VE (0.9 ± 0.04 SEM, $P \leq 0.02$), and LPS (0.8 ± 0.02 SEM, $P \leq 0.006$). In Figure 2.C, there was a significant increase in the NeuN immunoreactivity in the CA1 hippocampus region of rats submitted to LPS-induced neuroinflammation and treated with LPS+UG100 (1.01 ± 0.01 SEM) compared to the VE (0.9 ± 0.02 SEM, $P \leq 0.0003$), LPS+UG30 (0.9 ± 0.005 SEM, $P \leq 0.0002$) and LPS (0.9 ± 0.01 SEM, $P \leq 0.001$) groups. In Figure 2.D, the NeuN immunoreactivity

in the CA3 region of the hippocampus showed a significant increase in groups LPS+UG100 (0.99 ± 0.02 SEM) compared to the VE (0.9 ± 0.02 SEM P ≤ 0.02), LPS (0.8 ± 0.007 SEM, P ≤ 0.0002) and LPS+UG30 (0.9 ± 0.007 SEM, P ≤ 0.01) groups.

UG Treatment Increases Caspase-3 Death Marker in Hippocampus of Rats with Chronic-Recurrent Neuroinflammation

In Figure 3.A, we examined the immunoreactivity for Caspase-3 (CC3), a marker of cell death, in DG, CA1 and CA3 regions of the hippocampus in rats subjected to chronic-recurrent neuroinflammation induced by LPS and treated with UG. Regarding the immunoreactivity CC3 in the DG region (Figure 3.B), we observed a significant lower of CC3 in the VE group (0.6 ± 0.03 SEM) compared to the LPS (0.8 ± 0.01 SEM, P ≤ 0.002), LPS+UG30 (0.7 ± 0.03 SEM, P ≤ 0.01) and LPS+UG100 (0.7 ± 0.03 SEM, P ≤ 0.01) groups. In Figure 3.C, a significant increase in immunoreactivity for CC3 were observed in the LPS (0.8 ± 0.02 SEM, P ≤ 0.03) and LPS+UG30 (0.8 ± 0.03 SEM, P ≤ 0.01) groups in the CA1 hippocampus region compared to the VE (0.65 ± 0.04 SEM) group. In Figure 3.D, the immunoreactivity for CC3 in the CA3 region of the hippocampus showed a significant increase in the LPS (0.8 ± 0.01 SEM, P ≤ 0.02) group compared to the VE (0.66 ± 0.04 SEM) group.

UG treatment reduces microglial activation in hippocampus of rats with neuroinflammation induced by LPS

Figure 4.A, depicts the immunoreactivity for Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1), which is used as a microglial marker, in DG, CA1 and CA3 regions of the hippocampus in rats subjected to chronic-recurrent neuroinflammation induced by LPS and treated with UG. In regard to immunoreactivity Iba-1 in the GD of the hippocampus (Figure 4.B), we observed a significant difference between the VE (1.07 ± 0.009 SEM) compared LPS (1.19 ± 0.02 SEM, P ≤ 0.007), LPS+UG30 (1.17 ± 0.01 SEM, P ≤ 0.02) and LPS+UG100 (1.20 ± 0.04 SEM, P ≤ 0.003) groups. In Figure 4.C, in the CA1 region of the hippocampus, a significant decrease in immunoreactivity for Iba-1 were observed in the VE group (1.1 ± 0.01 SEM) when compared to the LPS (1.18 ± 0.02 SEM, P ≤ 0.04) and LPS+UG100 (1.22 ± 0.03 SEM, P ≤ 0.003)

groups respectively. Figure 4.D showed the immunoreactivity for Iba-1 in the CA3 region of the hippocampus, where we observed a significant decrease in the immunoreactivity for Iba-1 in the VE (1.10 ± 0.008 SEM) versus LPS (1.19 ± 0.03 SEM, P ≤ 0.03) and LPS+UG100 (1.23 ± 0.03 SEM, P ≤ 0.002) groups.

UG treatment attenuates LPS-induced GFAP immunoreactivity in hippocampal regions of rats

Figure 5.A depicts the immunoreactivity of GFAP, an intermediate filament protein found in astrocytes, in the regions of the DG, CA1 and CA3 of the hippocampus in rats subjected to chronic-recurrent neuroinflammation induced by LPS and treated with UG. Regarding immunoreactivity GFAP in the hippocampus GD (Figure 5B), we observed a significant increase in GFAP in the LPS (1,031 ± 0,01 SEM) versus VE (0.9 ± 0.008 SEM, P < 0.0001), LPS+UG30 (0.97 ± 0.003 SEM, P ≤ 0.01) and LPS+UG100 (0.96 ± 0,01 SEM, P ≤ 0.004). The VE group (0.9 ± 0.008 SEM) showed lower immunoreactivity to GFAP when compared to the LPS+UG30 (0.97 ± 0.003 SEM, P ≤ 0.007) and LPS+UG100 groups (0.96 ± 0.01 SEM, P ≤ 0.02). In Figure 5.C, a significant increase in the immunoreactivity for GFAP, in the CA1 region, was observed in the LPS group (1.01 ± 0.01 SEM) compared to the VE (0.89 ± 0.008 SEM, P ≤ 0.0001) and LPS+UG100 (0.95 ± 0.014 SEM, P ≤ 0.01) groups. Moreover, a significant difference was observed between VE (0.89 ± 0.008 SEM) versus LPS+UG30 (0.97 ± 0.007 SEM, P ≤ 0.002) and versus LPS+UG100 (0.95 ± 0.01 SEM, P ≤ 0.01). In Figure 5D, the immunoreactivity for GFAP, in the CA3 region, showed a significant increase in the VE group (0.91 ± 0.01 SEM) compared to all groups, LPS (1.0 ± 0.01 SEM, P ≤ 0.002), LPS+UG30 (1.0 ± 0.004 SEM, P ≤ 0.01) and LPS+UG100 (1.0 ± 0.02 SEM, P ≤ 0.04).

Discussion

Inflammation is a biological process that aims to eliminate invasive pathogens and promote wound healing. The neuroinflammatory pathway, which involves glial and neural cells, can be activated by various pathological insults, including infection, trauma, genetic antecedents, environmental factors and age [15]. In this study, we investigated the effects of the hydroalcoholic extract of *Uña de gato* on spatial memory and recognition, as well as neuronal loss and

regulation of glial reactivity in animals subjected to a recurrent model of chronic neuroinflammation induced by LPS.

Our study was intended to use the *Uña de gato* extract with *U. tomentosa* and *U. guianensis* types. The commercial preparations in Brazil use both plants, which differ in few constituents in the extract formulations [27]. *U. tomentosa* and *U. guianensis* contains approximately 0.5% of active alkaloids, which are primarily found in the bark [6], as well as other chemical components that have been shown to effectively treat respiratory inflammation induced by O_3 [28] and inhibit the release of interleukins in *in vivo* tests [29]. In addition, *in vitro* studies suggest that *U. tomentosa* may inhibit the activation of the transcriptional factor NF-κB [30–33] and attenuate inflammatory episodes by modulating neutrophil activation [4]. Our HPLC data for the extract show the presence of pentacyclic oxindolic alkaloids (uncarin D, uncarin F, mitraphylline, isomitraphylline, uncarin C and uncarin E), tetracyclic oxindolic alkaloids, indole alkaloids (augustine, ajmalicine), phenolic compounds (epicatechin and chlorogenic acid) and flavonoid glycoside (kaempferitrin). Additionally, the pentacyclic oxindolic alkaloids are considered markers of the plant extract and have been previously reported in studies characterizing *U. tomentosa* [6,34,35] and the kaempferitrin is considered marker exclusive of *U. guianensis* [27].

One of the main issues we are trying to answer is whether UG has any protective activity on memory. There are few studies that have attempted to answer this question. Castilhos et al. [19] found interesting results, where middle-aged rats treated with *U. tomentosa* at doses of 5 mg/kg, 15 mg/kg and 30 mg/kg improved spatial memory in the Morris water maze test (MWM). Xu et al. [5] also found that extract with *U. tomentosa* could significantly improve STZ-induced spatial memory and learning disabilities in rats on MWM. Our study brings complementary and more detailed results on the effects of UG on memory, here we also evaluated the spatial memory and the episodic memory of the animals, but considering the temporality of memory formation. Our results confirm the hypotheses of nootropic effects of UG on spatial memory using another behavioral task, the Y-maze, and both doses of UG were able to improve spatial memory. However, we go further, with the intention of also evaluating episodic memory in rats, using the spontaneous object recognition

task, and at both treated doses we found that UG was able to recover short-term (4 hours after training) and long-term (24 hours after training) memory of animals with chronic recurrent neuroinflammation. LPS is used to promote neuroinflammation and learning and memory deficits in animal models [36,37], since UG was able to reverse these effects. These findings suggest that UG may be a potential therapeutic agent for memory impairment. In addition, there were no significant differences in locomotor activity in the behavioral tests performed.

This is the first study to our knowledge that has examined the NeuN expression pattern in the hippocampus of animals with chronic neuroinflammation and treated with UG to explore differences in DG, CA1 and CA3 in NeuN expression. In immunofluorescence, the anti-NeuN antibody showed selective staining for neurons, where the highest dose of UG and not the lowest, showed increased expression of NeuN in the three regions investigated. Considering that cell density in DG is strongly correlated with working memory [38], inhibition of protein synthesis in the CA1 region impairs spatial learning in MWM [39], and that CA3 plays an important role in spatial and episodic memory because it has more enriched internal connectivity than other subregions [40]. Our data suggest that the UG has a potential neuroprotective effect by increasing NeuN expression and this may sustain the short-term as well as long-term memory improvement found in animals with chronic neuroinflammation. However, our results showed that chronic-recurrent neuroinflammation induced by LPS resulted in increased immunoreactivity of CC3, a marker of cell death, while UG in both doses failed to reverse this damage. Besides, *U. tomentosa* acts as an inhibitor of TNF-α of the NF-κB protein, and it has been observed that under these conditions, cell death can be increased as a form of defense [32].

Reactive astrogliosis is a pathological response characterized by the expression of GFAP, a protein considered a universal glial marker. Its main function is to identify brain damage, ensuring the survival and regeneration of neural network communication [13]. The GFAP, a marker of mature astrocytes, showed an increase in GFAP immunoreactivity in chronic-recurrent neuroinflammation induced by LPS. Besides, we observed a reversal of GFAP

immunoreactivity in the treatment with both doses of UG in the DG regions and at the highest dose in CA1, in the CA3 region. In addition, when we evaluate the specific marker of microglial cells, Iba-1, which is associated with the production of cytokines [41], we do not see a reduction in their immunoreactivity in any of the doses of UG treatment, and it is possible to observe an increase in immunoreactivity in the groups treated with the highest dose of UG in the three regions. Our findings differ from previous studies that have presented evidence that UG is an effective protective agent against inflammation [42–45], there are studies evaluating neuroprotective activity, using middle-aged animals treated for one month and 24 months with UG [19], *in vitro* tests with isolated alkaloids [46] and with damage induced by 6-OHDA [47]. They have an effect on memory, regulate reactivity and astrocyte formation, but are not able to reverse LPS-induced neuroinflammation in the classical model.

UG has therapeutic potential in reducing the damage induced by chronic recurrent neuroinflammation, particularly in spatial and episodic memory. However, it was not able to reverse microglia activation and cell death. Neuroinflammatory processes present a complexity that is still not fully understood and the present work provides information for future investigations using UG in other pathologies as well. Further investigations will still be conducted in order to develop treatments in which UG may be more effective.

Acknowledgments

The authors are grateful for all the support offered by the technician of the Pathology Research Teresinha Stein and Giuliano Guimarães. We would like to thank researcher Maria do Carmo dos Santos Araujo for her intellectual discussions and ideas for the research design.

Founding

The authors declare that no funds, grants, or other support were received during the preparation of this manuscript. The authors would like to thank the scholarships that allowed the execution of this project. These scholarships were funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) Finance Code 001. Fernanda Huf, Gabrielle N. da Silva, Luiz

Felipe C. Koenig and Adriana M. Zago received PhD scholarships from the CAPES program, and Jessié M. Gutierres was supported by the National Postdoctoral Program (PNPD/CAPES).

Declaration of conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be interpreted as a potential conflict of interest.

Author Contributions

All authors contributed to the study's conception and design. Euthanasia, material preparation and data collection were performed by Gabrielle N. da Silva, Jessiéh Martins Gutierres, Fernanda Huf, Adriana M. Zago, Anemarí G. de Azevedo, Luiz Felipe C. Koenig Renan F.M. Torres, Giuliano Rizzotto Guimarães, Augusto V. Pessi, Lais Pereira Lopes, Carolina Büttenbender, Fábio S. Barbosa. HPLC analysis were performed by Sarah Eller and Tiago F. de Oliveira. Statistical analysis was carried out by Gabrielle N. da Silva, Jessiéh Martins Gutierres, and Marilda da Cruz Fernandes. The first draft of the manuscript was written by Gabrielle N. da Silva, Jessiéh Martins Gutierres, and Marilda da Cruz Fernandes, all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

[1] D. da Paixão, R. Barboza, L. Valente, M. Souza, A. Siani, R. Pereira, B. Gallo, L. Berrueta, Polyphenol Profile and Quantitative Assessment of the Flavonoid Kaempferitrin in Wild and Cultivated Brazilian Amazonian Uncaria guianensis (Rubiaceae), Journal of the Brazilian Chemical Society. 32 (2021) 1670–1679. https://doi.org/10.21577/0103-5053.20210064.

[2] I. Urdanibia, F. Michelangeli, M.-C. Ruiz, B. Milano, P. Taylor, Anti-inflammatory and antitumoural effects of Uncaria guianensis bark, Journal of Ethnopharmacology. 150 (2013) 1154–1162. https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.055.

[3] J.A. Prieto Rodríguez, O.J. Patiño Ladino, L. Lesmes, J.M. Lozano, L.E. Cuca Suárez, Estudio fitoquímico de hojas de Uncaria guianensis y evaluación de actividad antibacteriana, Acta Amazonica. 41 (2011) 303–310. https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000200017.

[4] S. Montserrat-De La Paz, A. Fernandez-Arche, R. De La Puerta, A.M. Quilez, F. Jg Muriana, M. Dolores Garcia-Gimenez, B. Bermudez, Mitraphylline inhibits lipopolysaccharide-mediated activation of primary human neutrophils, Phytomedicine. 23 (2016) 141–148. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.12.015.

[5] Q.Q. Xu, P.C. Shaw, Z. Hu, W. Yang, S.P. Ip, Y.F. Xian, Z.X. Lin, Comparison of the chemical constituents and anti-Alzheimer's disease effects of Uncaria rhynchophylla and Uncaria tomentosa, Chinese Medicine (United Kingdom). 16 (2021) 1–15. https://doi.org/10.1186/s13020-021-00514-2.

[6] I.C.G. Honório, B.W. Bertoni, A.M.S. Pereira, Uncaria tomentosa and Uncaria guianensis an agronomic history to be written, Ciência Rural. 46 (2016) 1401–1410. https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150138.

[7] M.E. Heitzman, C.C. Neto, E. Winiarz, A.J. Vaisberg, G.B. Hammond, Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of Uncaria (Rubiaceae), Phytochemistry. 66 (2005) 5–29. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.10.022.

[8] J.E. Valdiviezo-Campos, C. Blanco-Olano, K. Olascuaga-Castillo, S. Rubio-Guevara, Uncaria tomentosa (Willd.) DC. (Rubiaceae): Especie nativa del Perú, medicamento herbolario reconocido por la medicina tradicional, Ethnobotany Research and Applications. 19 (2020). https://doi.org/10.32859/era.19.13.1-15.

[9] F. Cerbai, D. Lana, D. Nosi, P. Petkova-Kirova, S. Zecchi, H.M. Brothers, G.L. Wenk, M.G. Giovannini, The Neuron-Astrocyte-Microglia Triad in Normal Brain Ageing and in a Model of Neuroinflammation in the Rat Hippocampus, PLoS ONE. 7 (2012) e45250. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045250.

[10] A. Sood, K. Preeti, V. Fernandes, D.K. Khatri, S.B. Singh, Glia: A major player in glutamate–GABA dysregulation-mediated neurodegeneration, Journal of Neuroscience Research. 99 (2021) 3148–3189. https://doi.org/10.1002/jnr.24977.

[11] C. Giaume, F. Kirchhoff, C. Matute, A. Reichenbach, A. Verkhratsky, Glia: the fulcrum of brain diseases, Cell Death & Differentiation. 14 (2007) 1324–1335. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402144.

[12] N.J. Allen, D.A. Lyons, Glia as architects of central nervous system formation and function, Science. 362 (2018) 181–185. https://doi.org/10.1126/science.aat0473.

[13] M.T. Heneka, M.J. Carson, J. El Khoury, G.E. Landreth, F. Brosseron, D.L. Feinstein, A.H. Jacobs, T. Wyss-Coray, J. Vitorica, R.M. Ransohoff, K. Herrup, S.A. Frautschy, B. Finsen, G.C. Brown, A. Verkhratsky, K. Yamanaka, J. Koistinaho, E. Latz, A. Halle, G.C. Petzold, T. Town, D. Morgan, M.L. Shinohara, V.H. Perry, C. Holmes, N.G. Bazan, D.J. Brooks, S. Hunot, B. Joseph, N. Deigendesch, O. Garaschuk, E. Boddeke, C.A. Dinarello, J.C. Breitner, G.M. Cole, D.T. Golenbock, M.P. Kummer, Neuroinflammation in Alzheimer's disease, The Lancet Neurology. 14 (2015) 388–405. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5.

[14] T. Shabab, R. Khanabdali, S.Z. Moghadamtousi, H.A. Kadir, G. Mohan, Neuroinflammation pathways: a general review, International Journal of Neuroscience. 127 (2017) 624–633. https://doi.org/10.1080/00207454.2016.1212854.

[15] F. Leng, P. Edison, Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?, Nature Reviews Neurology. 17 (2021) 157–172. https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y.

[16] G. Cao, Y. Zhang, L. Zhu, J. Zhu, N. Zhao, N. Dong, Y. Dang, Y. Chen, T. Chen, The inhibitory effect of levo-tetrahydropalmatine on the methamphetamine-induced spatial memory impairment in mice, Neuroscience Letters. 672 (2018) 34–39. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.02.018.

[17] S.G. Sreenivasmurthy, A. Iyaswamy, S. Krishnamoorthi, S. Senapati, S. Malampati, Z. Zhu, C.-F. Su, J. Liu, X.-J. Guan, B.C.-K. Tong, K.-H. Cheung, J.-Q. Tan, J.-H. Lu, S.S.K. Durairajan, J.-X. Song, M. Li, Protopine promotes the proteasomal degradation of pathological tau in Alzheimer's disease models via HDAC6 inhibition, Phytomedicine. 96 (2022) 153887. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153887.

[18] Y.-F. Xian, Z.-R. Su, J.-N. Chen, X.-P. Lai, Q.-Q. Mao, C.H.K. Cheng, S.-P. Ip, Z.-X. Lin, Isorhynchophylline improves learning and memory impairments induced by D-galactose in mice, Neurochemistry International. 76 (2014) 42–49. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.06.011.

[19] L.G. Castilhos, J.S. Oliveira, S.A. Adefegha, A.G. Manzoni, D.F. Passos, C.E. Assmann, L.L. Silveira, K.B. Trelles, M. Kronbauer, P.H. Doleski, J.M. Bremm, J. Braun, F.H. Abdalla, J.F. Gonçalves, C.M. Andrade, I.B.M. Cruz, M.E. Burger, D.B.R. Leal, Uncaria tomentosa improves cognition, memory and learning in middle-aged rats, Experimental Gerontology. 138 (2020) 111016. https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.111016.

[20] N. Kustrimovic, F. Marino, M. Cosentino, Peripheral Immunity, Immunoaging and Neuroinflammation in Parkinson's Disease, Current Medicinal Chemistry. 26 (2019) 3719–3753.

https://doi.org/10.2174/092986732566618100916104 8.

[21] W. Duan, Y.-P. Zhang, Z. Hou, C. Huang, H. Zhu, C.-Q. Zhang, Q. Yin, Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator, Molecular Neurobiology. 53 (2016) 1637–1647. https://doi.org/10.1007/s12035-015-9122-5.

[22] N. Louneva, J.W. Cohen, L.Y. Han, K. Talbot, R.S. Wilson, D.A. Bennett, J.Q. Trojanowski, S.E. Arnold, Caspase-3 is enriched in postsynaptic densities and increased in Alzheimer's disease, American Journal of Pathology. 173 (2008) 1488–1495. https://doi.org/10.2353/AJPATH.2008.080434.

[23] L.S. Tortorelli, D.S. Engelke, P. Lunardi, T. Mello e Souza, J.G. Santos-Junior, C.-A. Gonçalves, Cocaine counteracts LPS-induced hypolocomotion and triggers locomotor sensitization expression, Behavioural Brain Research. 287 (2015) 226–229. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.03.054.

[24] A.A. Dreifuss, A.L. Bastos-Pereira, T.V. Ávila, B. da S. Soley, A.J. Rivero, J.L. Aguilar, A. Acco, Antitumoral and antioxidant effects of a hydroalcoholic extract of cat's claw (Uncaria tomentosa) (Willd. Ex Roem. & Schult) in an in vivo carcinosarcoma model, Journal of Ethnopharmacology. 130 (2010) 127–133. https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.029.

[25] S.M. Pacheco, M.S.P. Soares, J.M. Gutierres, 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, The Journal of Nutritional Biochemistry. 56 (2018) 193–204. https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2018.02.014.

[26] J.C. Dodart, C. Mathis, A. Ungerer, Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice, NeuroReport. 8 (1997) 1173–1178. https://doi.org/10.1097/00001756-199703240-00023.

[27] L.M.M. Valente, C.H.B. Bizarri, S. Liechocki, R.S. Barboza, D. da Paixão, M.B.S. Almeida, P.J.C. Benevides, A. Magalhães, A.C. Siani, Kaempferitrin from Uncaria guianensis (Rubiaceae) and its potential as a chemical marker for the species, Journal of the Brazilian Chemical Society. 20 (2009) 1041–1045. https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000600007.

[28] F.J. Cisneros, M. Jayo, L. Niedziela, An Uncaria tomentosa (cat's claw) extract protects mice against ozone-induced lung inflammation, Journal of Ethnopharmacology. 96 (2005) 355–364. https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.06.039.

[29] R. Rojas-Duran, G. González-Aspajo, C. Ruiz-Martel, G. Bourdy, V.H. Doroteo-Ortega, J. Alban-Castillo, G. Robert, P. Auberger, E. Deharo, Anti-inflammatory activity of Mitraphylline isolated from Uncaria tomentosa bark, Journal of Ethnopharmacology. 143 (2012) 801–804. https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.015.

[30] Sandoval-Chacón, Thompson, Zhang, Liu, Mannick, Sadowska-Krowicka,

Charbonnet, Clark, Miller, Antiinflammatory actions of cat's claw: the role of NF-κB, Alimentary Pharmacology & Therapeutics. 12 (1998) 1279–1289. https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.1998.00424.x.

[31] M. Sandoval, R.M. Charbonnet, N.N. Okuhama, J. Roberts, Z. Krenova, A.M. Trentacosti, M.J.. Miller, Cat's claw inhibits TNFα production and scavenges free radicals: role in cytoprotection, Free Radical Biology and Medicine. 29 (2000) 71–78. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00327-0.

[32] L. Allen-Hall, J.T. Arnason, P. Cano, R.M. Lafrenie, Uncaria tomentosa acts as a potent TNF-α inhibitor through NF-κB, Journal of Ethnopharmacology. 127 (2010) 685–693. https://doi.org/10.1016/J.JEP.2009.12.004.

[33] B.C. Azevedo, L.J.F. Morel, F. Carmona, T.M. Cunha, S.H.T. Contini, P.G. Delprete, F.S. Ramalho, E. Crevelin, B.W. Bertoni, S.C. França, M.C. Borges, A.M.S. Pereira, Aqueous extracts from Uncaria tomentosa (Willd. ex Schult.) DC. reduce bronchial hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of asthma, Journal of Ethnopharmacology. 218 (2018) 76–89. https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.013.

[34] P. Montoro, V. Carbone, J. de Dioz Zuniga Quiroz, F. De Simone, C. Pizza, Identification and quantification of components in extracts ofUncaria tomentosa by HPLC-ES/MS, Phytochemical Analysis. 15 (2004) 55–64. https://doi.org/10.1002/pca.740.

[35] S. Alvarenga-Venutolo, C. Rosales-López, L.S. Chinchilla, R.M. Arrieta, F.A. Cascante, Seasonality effect on the composition of oxindole alkaloids from distinct organs of Uncaria tomentosa from the Caribbean region of Costa Rica, Phytochemistry. 151 (2018) 26–31. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.03.008.

[36] P.K. Frühauf-Perez, F.R. Temp, M.M. Pillat, C. Signor, A.L. Wendel, H. Ulrich, C.F. Mello, M.A. Rubin, Spermine protects from LPS-induced memory deficit via BDNF and TrkB activation, Neurobiology of learning and memory. 149 (2018) 135–143. https://doi.org/10.1016/J.NLM.2018.02.012.

[37] J. Go, H.-Y. Park, D.W. Lee, S.-Y. Maeng, I.-B. Lee, Y.J. Seo, J.-P. An, W.K. Oh, C.-H. Lee, K.-S. Kim, Humulus japonicus attenuates LPS-and scopolamine-induced cognitive impairment in mice, Laboratory animal research. 38 (2022). https://doi.org/10.1186/S42826-022-00134-3.

[38] V. Hernández-Rabaza, J.A. Barcia, M. Llorens-Martín, J.L. Trejo, J.J. Canales, Spared place and object-place learning but limited spatial working memory capacity in rats with selective lesions of the dentate gyrus, Brain Research Bulletin. 72 (2007) 315–323. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.01.013.

[39] N. Naghdi, N. Majlessi, T. Bozorgmehr, The effects of anisomycin (a protein synthesis inhibitor) on spatial learning and memory in CA1 region of rats hippocampus, Behavioural Brain Research. 139 (2003) 69–73. https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00060-8.

[40] E. Cherubini, R. Miles, The CA3 region of the hippocampus: how is it? What is it for? How does it do it?, Frontiers in Cellular Neuroscience. 9

(2015) 19. https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00019.

[41] K. Piotrowska, S. Słuczanowska-Głabowska, M. Kurzawski, V. Dziedziejko, P. Kopytko, E. Paczkowska, D. Rogińska, K. Safranow, B. Machaliński, A. Pawlik, Over-Expression of Allograft Inflammatory Factor-1 (AIF-1) in Patients with Rheumatoid Arthritis, Biomolecules. 10 (2020) 1064. https://doi.org/10.3390/biom10071064.

[42] E. Mur, F. Hartig, G. Eibl, M. Schirmer, Randomized double blind trial of an extract from the pentacyclic alkaloid-chemotype of uncaria tomentosa for the treatment of rheumatoid arthritis., The Journal of rheumatology. 29 (2002) 678–81. www.jrheum.org (acessado 16 de julho de 2023).

[43] M. Sandoval, N.N. Okuhama, X.J. Zhang, L.A. Condezo, J. Lao, F.M. Angeles, R.A. Musah, P. Bobrowski, M.J.S. Miller, Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (Uncaria tomentosa and Uncaria guianensis) are independent of their alkaloid content, Phytomedicine. 9 (2002) 325–337. https://doi.org/10.1078/0944-7113-00117.

[44] C. GONCALVES, T. DINIS, M. BATISTA, Antioxidant properties of proanthocyanidins of bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity, Phytochemistry. 66 (2005) 89–98. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.10.025.

[45] M. V. Carvalho, C. Penido, A.C. Siani, L.M.M. Valente, M.G.M.O. Henriques, Investigations on the anti-inflammatory and anti-allergic activities of the leaves of Uncaria guianensis (Aublet) J. F. Gmelin, Inflammopharmacology. 14 (2006) 48–56. https://doi.org/10.1007/S10787-006-1509-5/METRICS.

[46] M.A. Tan, S.S.A. An, Neuroprotective potential of the oxindole alkaloids isomitraphylline and mitraphylline in human neuroblastoma SH-SY5Y cells, 3 Biotech. 10 (2020) 517. https://doi.org/10.1007/s13205-020-02535-4.

[47] Z. Shi, Z. Lu, Y. Zhao, Y. Wang, X. Zhao-Wilson, P. Guan, X. Duan, Y.Z. Chang, B. Zhao, Neuroprotective effects of aqueous extracts of Uncaria tomentosa: Insights from 6-OHDA induced cell damage and transgenic Caenorhabditis elegans model, Neurochemistry International. 62 (2013) 940–947. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.03.001.

Legends

Table 1. Main compounds detected and identified in *Uña de gato* bark extract.

Table 2. Main compounds detected and unidentified in *Uña de gato* bark extract.

Figure 1. Effects of treatment with *Uña de gato*, (30 mg/kg and 100 mg/kg) on locomotor activity (open-field task, OF), spatial memory (Y-maze Task, YM), and recognition memory (object recognition task, ORT) in the chronic-recurrent neuroinflammation animals. [A] illustration of the experimental design; [B] time spent in the center of OF; [C] time spent in the periphery of OF; [D] number of crossing in OF; [E] number of rearing in OF; [F] index for short-term memory in ORT; [G] index for long-term memory in ORT; [H] time spent in the novel arm in the Y-maze task; [I] number of entries in the novel arm in the Y-maze task. Statistical significance was determined using a One-way ANOVA (with Tukey post hoc comparison) at *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 and ****P < 0.0001. Data for YM and ORT are expressed as mean ± standard error of the mean, while for OF data are expressed as median with interquartile range, n = 6 - 10;

Figure 2. Effects of treatment with *Uña de gato* (30 mg/kg and 100 mg/kg) on immunofluorescence for mature neurons staining with anti-NeuN (green) and counterstained with DAPI (blue) in the subfields of hippocampus in rats with chronic-recurrent neuroinflammation. [A] Representative image for immunoreactivity of anti-NeuN in the dentate gyrus (DG), *cornu Ammonis* 1 (CA1) and, *cornu Ammonis* 3 (CA3) regions of hippocampus in the VE, LPS, LPS+UG30 and LPS+UG100 groups; [B] immunostained of anti-NeuN in DG; [C] immunostained of anti-NeuN in CA1; [D] immunostained of anti-NeuN in CA3. Statistical significance was determined using a One-way ANOVA (with Tukey post hoc comparison) at *P < 0.05 and **P < 0.01, ***P < 0.001. Data expressed as mean ± standard error of mean for n = 5. Scale bar = 200 μm.

Figure 3. Effects of treatment with *Uña de gato* (30 mg/kg and 100 mg/kg) on immunofluorescence for anti-Caspase 3 clivated (CC3, red) and counterstained with DAPI (blue) in the subfields of hippocampus in rats with chronic-recurrent neuroinflammation. [A] Representative image for immunoreactivity of anti-CC3 in the dentate gyrus (DG), *cornu Ammonis* 1 (CA1) *and*, *cornu Ammonis 3* (CA3) regions of hippocampus in the VE, LPS, LPS+UG30 and LPS+UG100 groups; [B] immunostained of anti-CC3 in DG; [C] immunostained of anti-CC3 in CA1; [D] immunostained of anti-CC3 in CA3. Statistical significance was determined using a One-way ANOVA (with Tukey post hoc comparison) at *P < 0.05 and **P < 0.01. Data expressed as mean ± standard error of mean for n = 5. Scale bar = 200 µm.

Figure 4. Effects of treatment with *Uña de gato* (30 mg/kg and 100 mg/kg) on immunofluorescence for anti-Iba1 (red) and counterstained with DAPI (blue) in the subfields of hippocampus in rats with chronic-recurrent neuroinflammation. [A] Representative image for immunoreactivity of anti-Iba-1 in the dentate gyrus (DG*), cornu Ammonis* 1 (CA1) and, *cornu Ammonis* 3 (CA3) regions of hippocampus in the VE, LPS, LPS+UG30 and LPS+UG100 groups; [B] immunostained of anti-Iba-1 in DG; [C] immunostained of anti-Iba-1 in CA1; [D] immunostained of anti-Iba-1 in CA3. Statistical significance was determined using a One-way ANOVA (with Tukey post hoc comparison) at *P < 0.05 and **P < 0.01. Data expressed as mean ± standard error of mean for n = 5. Scale bar = 200 µm.

Figure 5. Effects of treatment with *Uña de gato* (30 mg/kg and 100 mg/kg) on immunofluorescence for anti-GFAP (red) and counterstained with DAPI (blue) in the subfields of hippocampus in rats with chronic-recurrent neuroinflammation. A Representative image for immunoreactivity of anti-GFAP in the dentate gyrus (DG), *cornu Ammonis* 1 (CA1) and, *cornu Ammonis* 3 (CA3) regions of hippocampus in the VE, LPS, LPS+UG30 and LPS+UG100 groups; B immunostained of anti-GFAP in DG; C immunostained of anti-GFAP in CA1; D immunostained of anti-GFAP in CA3. Statistical significance was determined using a One-way ANOVA (with Tukey post hoc comparison) at *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 and ****P < 0.0001. Data expressed as mean ± standard error of mean for n = 5. Scale bar = 200 μm.

Tables

Table 1. Main compounds detected and identified.

Name	[M+H]+	Monoisotopic Mass
5 Pentacyclic alkaloids*	*m/z* 369.1903	368.1736
2 Tetracyclic alkaloids	*m/z* 385.2022	384.1819
Angustine	*m/z* 314.1481	313.1215
Epicatechin	*m/z* 291.2012	290.0790
Ajmalicine	*m/z* 353.1924	352.1786
3-isoamalicin	*m/z* 353.1924	352.1786
Kaempferitrin	*m/z* 579.1801	578.1635
Chlorogenic acid	*m/z* 355.1109	354.0950

* Probably Uncarina D, mitraphylline, Uncarina F, isomitraphylline and isopteropodin.

Table 2. Main compounds detected and unidentified.

Name**	[M+H]+
Compound 01	*m/z* 374.3094
Compound 02	*m/z* 396.2964
Compound 03	*m/z* 418.2775
Compound 04	*m/z* 372.2936
Compound 05	*m/z* 440.3521

Compound 06	*m/z* 274.1746
Compound 07	*m/z* 374.2986
Compound 08	*m/z* 483.4947
Compound 09	*m/z* 507.2623
Compound 10	*m/z* 536.6006

**Listed by time

Figures

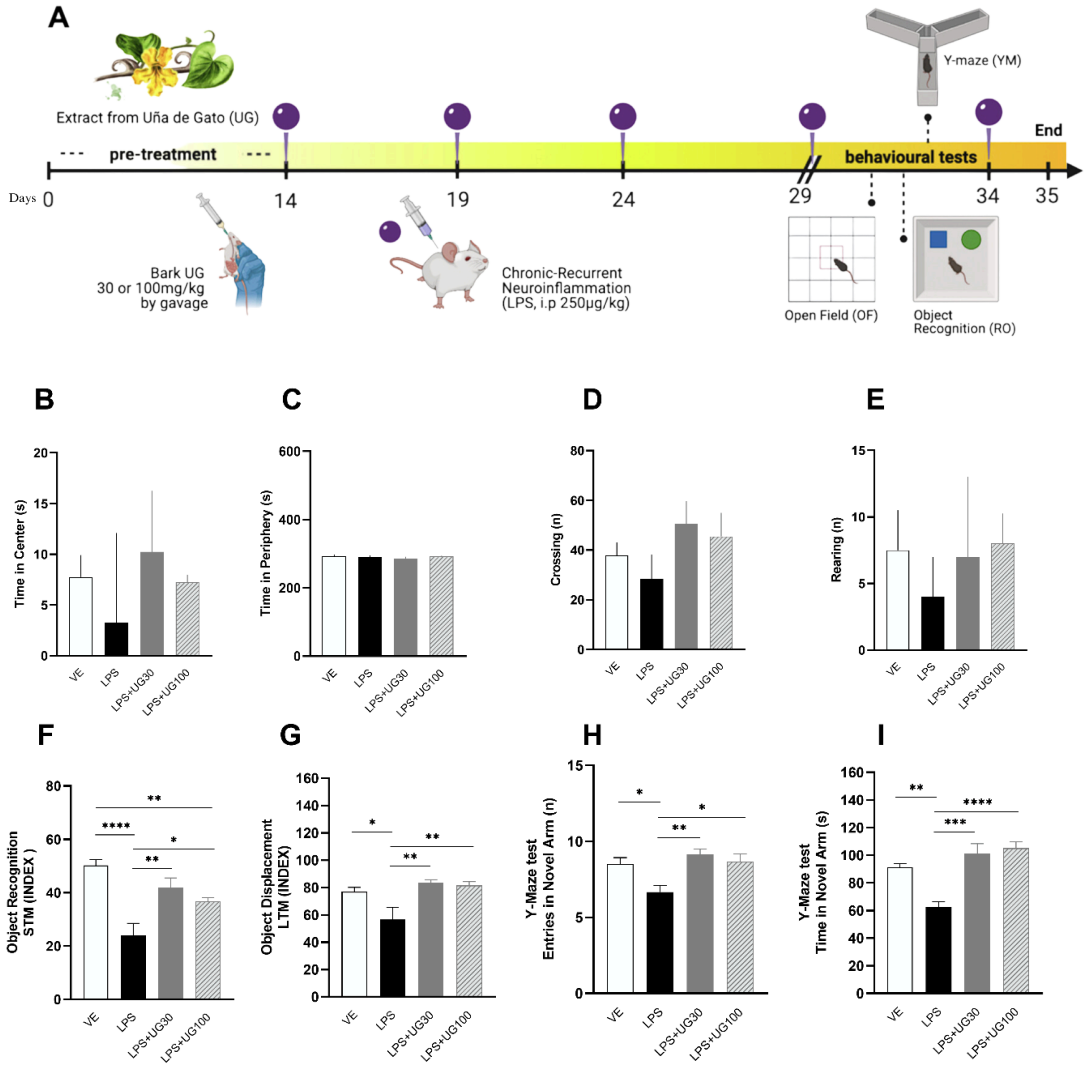


Figure 1.

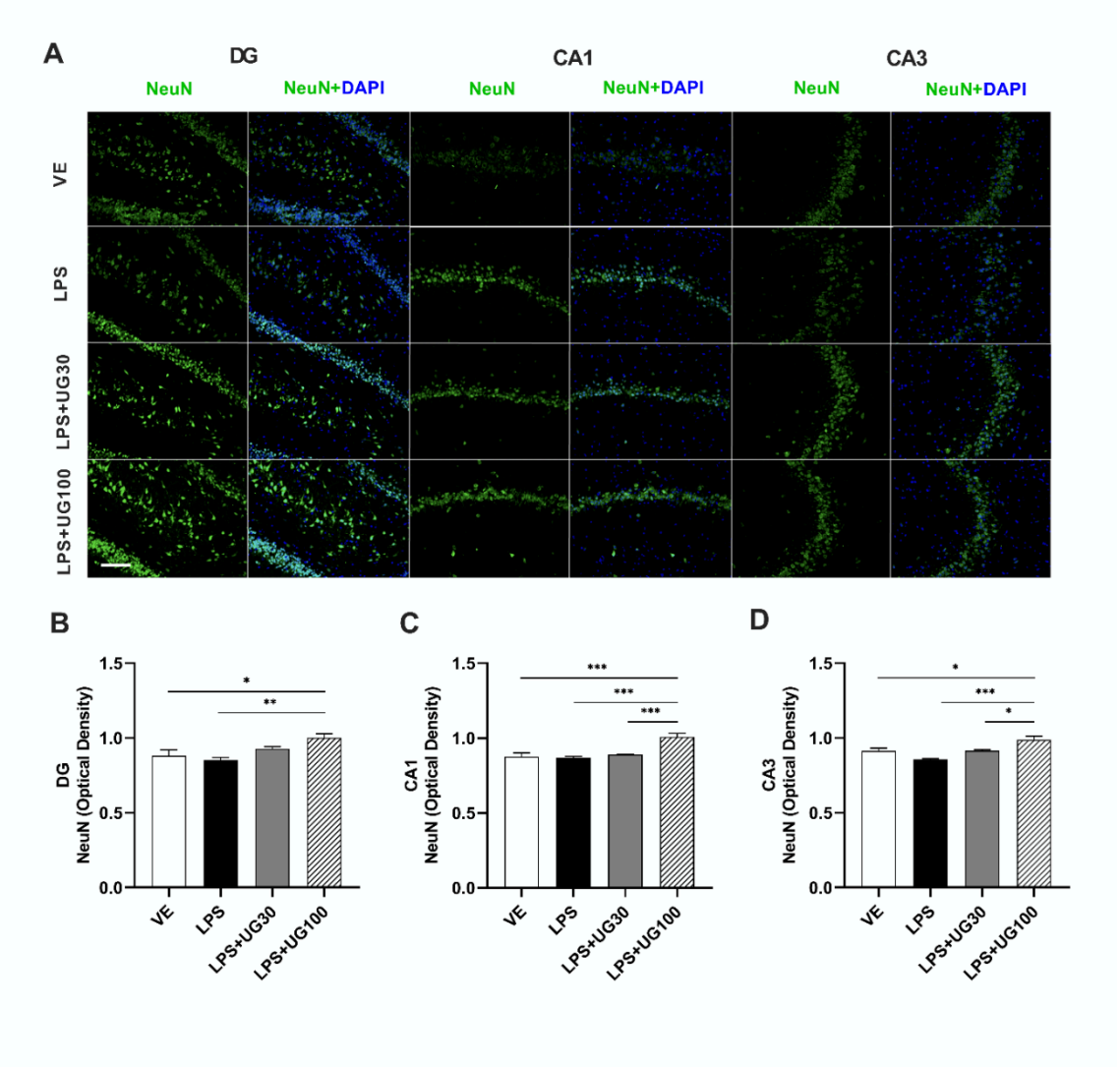

A
DG
CA1
CA3
NeuN
NeuN+DAPI
NeuN
NeuN+DAPI
NeuN
NeuN+DAPI
VE
LPS
LPS+UG30
LPS+UG100
B
C
D
DG NeuN (Optical Density)
CA1 NeuN (Optical Density)
CA3 NeuN (Optical Density)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
**
***
***
***
*
***
*
VE
LPS
LPS+UG30
LPS+UG100

Figure 2.

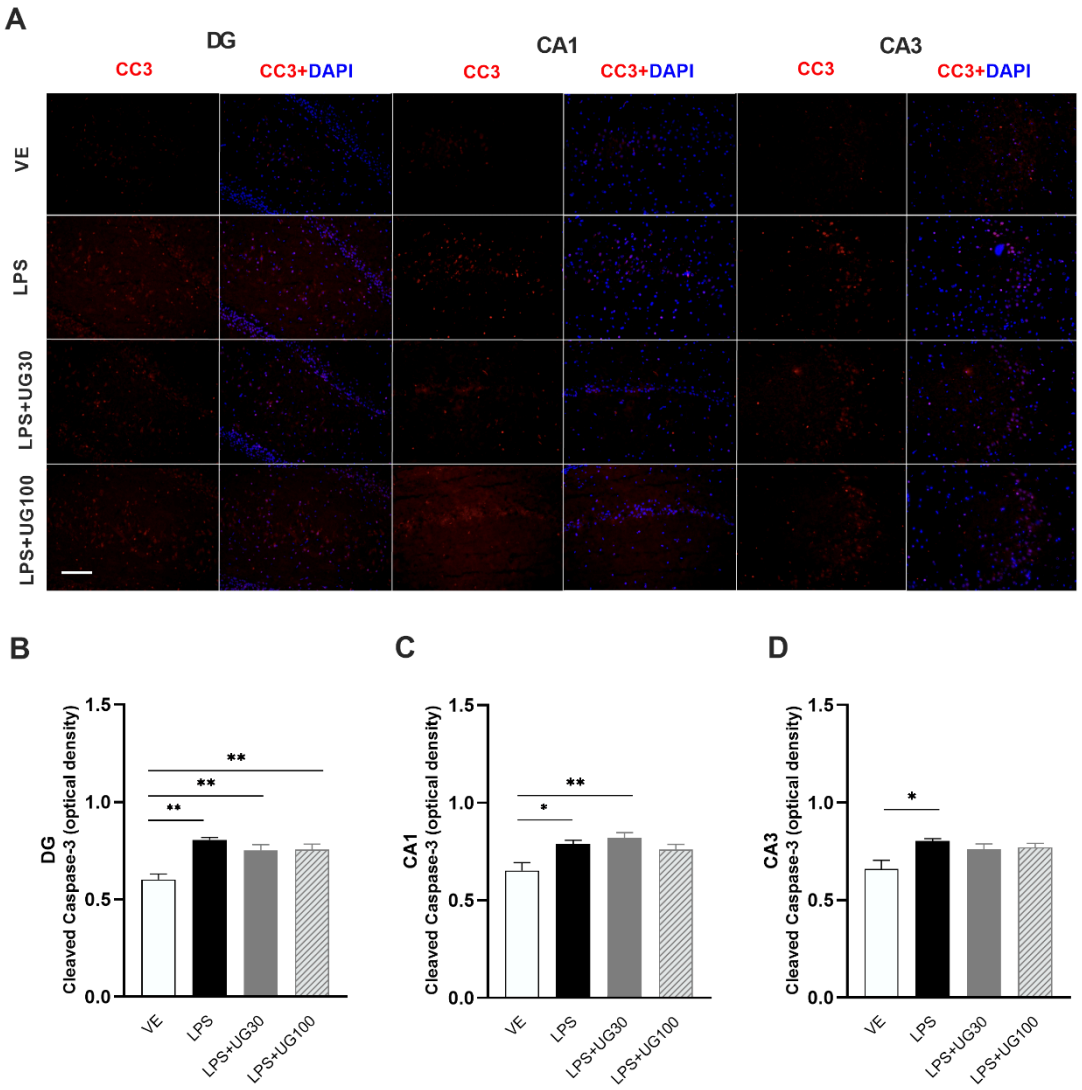

A
DG
CA1
CA3
CC3
CC3+DAPI
CC3
CC3+DAPI
CC3
CC3+DAPI
VE
LPS
LPS+UG30
LPS+UG100
B
C
D
DG
CA1
CA3
Cleaved Caspase-3 (optical density)
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
**
**
*
*
VE
LPS
LPS+UG30
LPS+UG100

Figure 3.

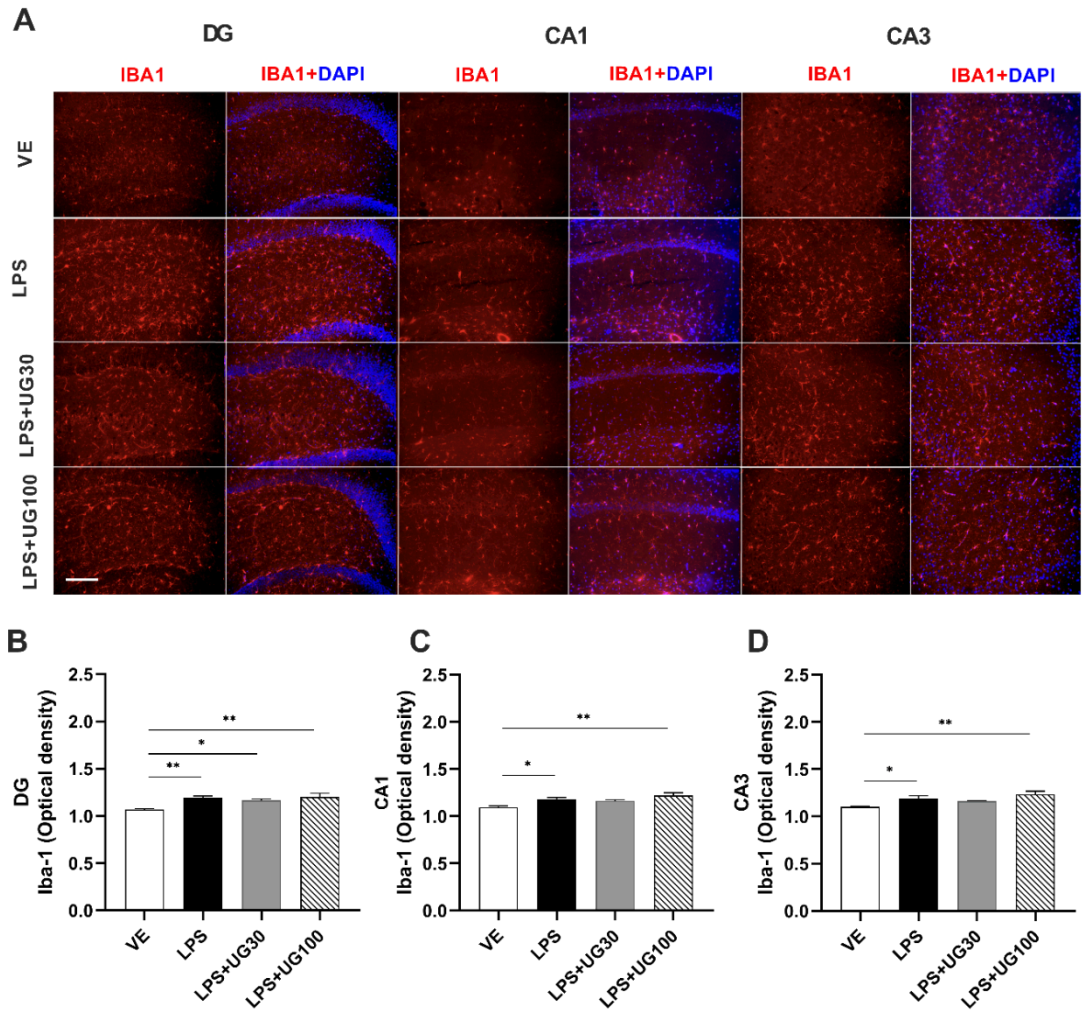

A
DG
CA1
CA3
IBA1
IBA1+DAPI
IBA1
IBA1+DAPI
IBA1
IBA1+DAPI
VE
LPS
LPS+UG30
LPS+UG100
B
C
D
DG
Iba-1 (Optical density)
CA1
Iba-1 (Optical density)
CA3
Iba-1 (Optical density)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
**
VE
LPS
LPS+UG30
LPS+UG100

Figure 4.

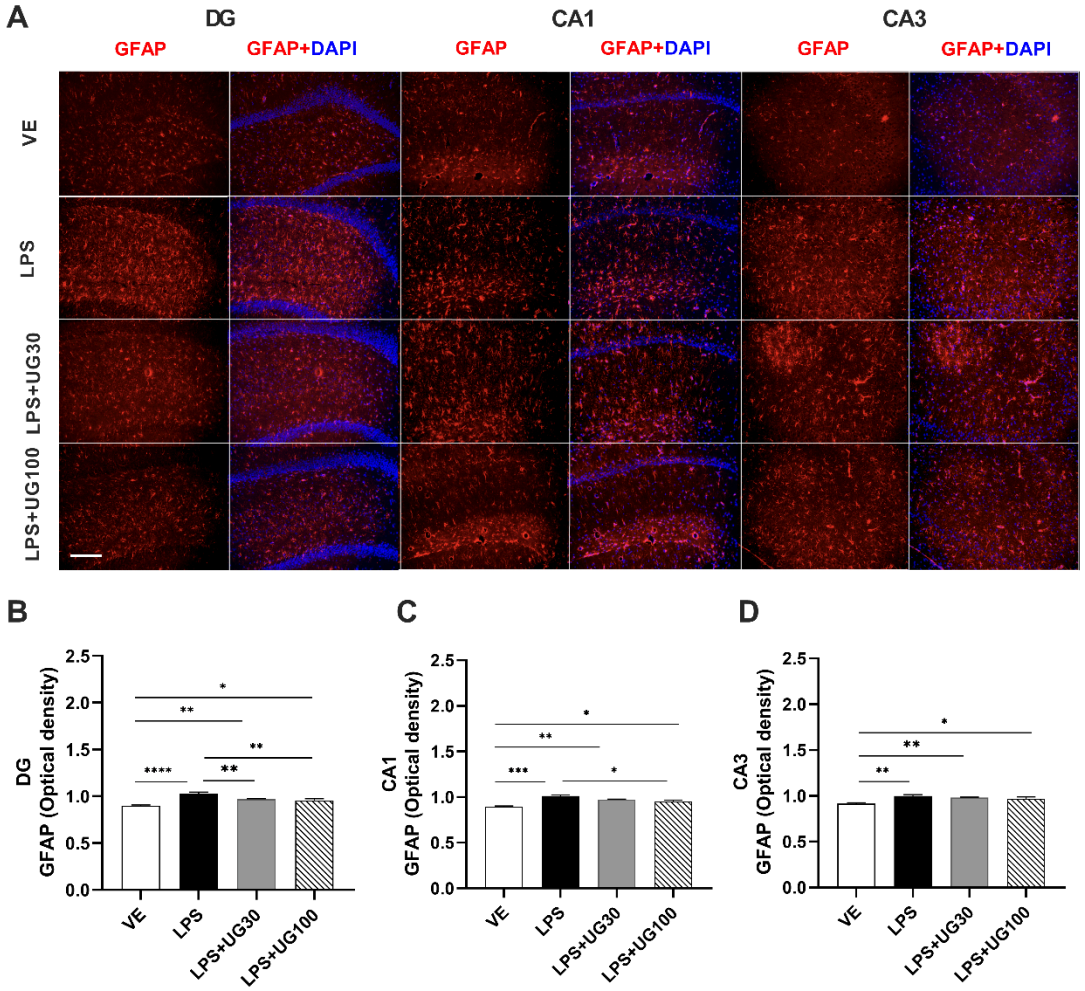

A
DG
CA1
CA3
GFAP
GFAP+DAPI
GFAP
GFAP+DAPI
GFAP
GFAP+DAPI
VE
LPS
LPS+UG30
LPS+UG100
B
C
D
DG GFAP (Optical density)
CA1 GFAP (Optical density)
CA3 GFAP (Optical density)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
VE
LPS
LPS+UG30
LPS+UG100

Figure 5.

5 CONCLUSÕES

Nossos achados demonstram que o uso da Unha de gato tem um impacto positivo na memória de curto e longo prazo, na memória espacial, na proteção de neurônios maduros no hipocampo e na redução da astrogliose em animais com comprometimento cognitivo relacionado à neuroinflamação crônica recorrente. Esses achados sugerem que a unha de gato pode ser uma promissora intervenção para melhorar a função cognitiva e a saúde neural em indivíduos com condições neurodegenerativas. No entanto, são necessárias mais pesquisas para entender completamente os mecanismos subjacentes a esses efeitos e para avaliar a aplicabilidade clínica dessas descobertas em humanos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo representa uma parcela significativa de um projeto mais abrangente, intitulado “Avaliação dos efeitos neuroprotetores de diferentes frações da planta *Uncaria tomentosa* sobre as respostas de neuroglia, neurogênese e memória em modelos animais para a neuroinflamação e doença de Alzheimer”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEUA) da UFCSPA (Parecer N° 280/20) (Anexo).

A partir desta iniciativa, conduzimos o modelo de neuroinflamação em ratos Wistar, conforme detalhado nesta dissertação. Para complementar nossa investigação, foram conduzidos testes comportamentais e análises de imunofluorescência.

A base deste estudo é fundamentada no potencial efeito anti-inflamatório dos gêneros de *Uncaria*, amplamente distribuídos na flora da América Central e do Sul. Considerando os conhecidos efeitos da neuroinflamação SNC, torna-se necessário o conhecimento de como a Unha de gato pode ser aplicada nesse contexto. Desvendando os impactos da Unha de gato em modelos animais, este estudo busca oferecer contribuições significativas, aptas a guiar futuras intervenções terapêuticas em distúrbios neuroinflamatórios.

7 Anexo

7.1 Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 280/20

2) DATA DO PARECER: 11/11/2020 Parecer 719/20

3) TÍTULO DO PROJETO:

Avaliação dos efeitos neuroproterores de diferentes frações da planta *Uncaria tomentosa* sobre as respostas de neuroglia, neurogênese e memória em modelos animais para a neuroinflamação e doença de Alzheimer

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Marilda da Cruz Fernandes

5) RESUMO DO PROJETO:

Por muitos anos, se acredita que as doenças degenerativas do cérebro humano estejam principalmente associadas à disfunção ou morte de células neurais. No entanto, evidências emergentes apontam para a disfunção nas comunicações neurônio-glia desempenhando um papel tão ou mais importante. Em relação aos tratamentos farmacológicos para a doença de Alzheimer (DA), a terapia colinomimética tem sido amplamente empregada, no entanto, outras estratégias farmacológicas tem sido pesquisadas, pois não são todos os pacientes que respondem bem ao tratamento convencional, e a utilização de medicamentos fitoterápicos potenciais estão sendo utilizados cada vez mais no tratamento de inúmeras patologias, inclusive na DA. A *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C ou também conhecida como "Unha de Gato" é uma planta arbustiva natural da floresta Amazônica, e estudos mais recentes com o extrato dessa planta tem mostrado ser uma solução natural alternativa para prevenir e reduzir placas senis e "emaranhados" neurofibrilares cerebrais em modelos animais para a DA. Portanto, o objetivo deste trabalho será investigar os efeitos de diferentes de frações de Uncaria tomentosa na regulação, desenvolvimento, glioproteção e neuroproteção em animais submetidos a um modelo de neuroinflamação e de demência esporádica do tipo Alzheimer. Serão utilizados ratos Wistar machos (n=180), onde no protocolo I os animais receberão Salina (2ml/kg/dia), *Uncaria tomentosa* em duas frações, F1 (Fração proantocianidina, 25mg/kg/dia), F2 (Fração Alcaloides Totais, 20mg/kg/dia) e LPS (8µg/µl em um volume de 3µl, ICV) por 24 dias, e no segundo protocolo os animais receberão Salina (2ml/kg/dia), *Uncaria tomentosa*, F1, *Uncaria tomentosa*, F2, STZ (3mg/kg, ICV), Tacrina (5mg/kg/dia, IP), Donepezil (5mg/kg/dia, IP), Galantamina (4mg/kg/dia, IP), Rivastigmina (4mg/kg/dia, IP) durante 28 dias. Serão analisados os parâmetros comportamentais de locomoção, aprendizado e memória, avaliação imunofluorescente de marcadores para neuroinflamação, reatividade astrocitária,

reguladores da maturação de astrócitos, fator transcricional astrocitário, de neurônios adultos e na sobrevivência, diferenciação e proliferação neuronal nas regiões CA1, CA2, CA3 e giro denteado do hipocampo destes animais. Este projeto é uma oportunidade para avaliar o efeito potencial da *Uncaria tomentosa* na DA tendo como foco principal a Glia, dando ênfase para a formação, regulação e desenvolvimento dos astrócitos em resposta a insultos inflamatórios no cérebro desses animais e na demência esporádica do tipo Alzheimer, uma vez que os estudos recentes mostram importante neuroproteção com esta planta associado a proteção sobre neurônios, e nesse projeto investigaremos qual é o papel da *Uncaria tomentosa* sobre a Glia nessas alterações, o que não foi ainda elucidado.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Investigar os efeitos de diferentes de frações de *Uncaria tomentosa* na regulação, desenvolvimento, glioproteção e neuroproteção em animais submetidos a um modelo de neuroinflamação e de demência esporádica do tipo Alzheimer

7) FINALIDADE DO PROJETO: [ ] Ensino [x] Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título	[x] Adequado	[ ] Comentários
Introdução	[x] Adequada	[ ] Comentários
Objetivos	[x] Adequados	[ ] Comentários
Relevância e Justificativa	[x] Adequados	[ ] Comentários
Materiais e Métodos	[x] Adequados	[ ] Comentários
Cronograma para execução da pesquisa	[x] Adequado	[ ] Comentários
Orçamento e fonte financiadora	[x] Adequados	[ ] Comentários
Referências Bibliográficas	[x] Adequadas	[ ] Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

[x] Sim [ ] Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B [ ] C [ ] D [x] E [ ]
Justifique:

Cirurgia para injeção intraventricular de composto e exposição a diferentes ambientes

Espécie: *Ratos Wistar (Rattus norvegicus albinus)* **Número Amostral:** 180

Redução Amostral: [ ] Sim [x] Não
Justifique:

Substituição de Metodologia: [ ] Sim [x] Não
Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia: [ ] Sim [x] Não
Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais: [x] Adequada [ ] Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: [x] Adequada [ ] Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): [x] Adequada [ ] Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Anestesia dos animais (se aplicável): [x] Adequada [ ] Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): [x] Adequada [ ] Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Labotarório):

Outra instituição. Qual? Laboratório de Patologia, Biotério da UFCSPA

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS: Não apresentado

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
X	*Ratos Wistar (Rattus norvegicus albinus)*	M	180

12) RECOMENDAÇÃO: As pendências deverão ser respondidas em uma carta, indicando as páginas do projeto que foram alteradas (nova versão), assinadas pelo pesquisador responsável.

[x] Aprovado

[ ] Com Pendência

[ ] Não aprovado

Data de início 15/01/2021 Data de Término 15/08 /2025

Coordenadora CEUA UFCSPA

Comentários gerais sobre o projeto: