

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

Fernanda Huf

**ALTERAÇÕES MNEMÔNICAS E
IMUNORREATIVIDADE PARA
POPULAÇÕES DE NEURÔNIOS E
CÉLULAS GLIAIS NO HIPOCAMPO:
EFEITOS DA TAURINA EM UM
MODELO DE DEMÊNCIA ESPORÁDICA
DO TIPO ALZHEIMER**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2023**

Fernanda Huf

**ALTERAÇÕES MNEMÔNICAS E IMUNORREATIVIDADE PARA POPULAÇÕES
DE NEURÔNIOS E CÉLULAS GLIAIS NO HIPOCAMPO: EFEITOS DA TAURINA
EM UM MODELO DE DEMÊNCIA ESPORÁDICA DO TIPO ALZHEIMER**

Tese 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 Doutor.

Orientadora: Dra. Marilda da Cruz Fernandes
Coorientador: Dr. Jessié Martins Gutierrez

**Porto Alegre
2023**

Catálogo na Publicação

Huf, Fernanda

Alterações mnemônicas e imunorreativas para populações de neurônios e células gliais no hipocampo: efeitos da taurina em um modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer / Fernanda Huf. -- 2023.

101 f. : 30 cm.

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

Orientador(a): Prof Dra Marilda da Cruz Fernandes ;
coorientador(a): Dr Jessié Martins Gutierrez.

1. Doença de Alzheimer. 2. Estreptozotocina. 3. Taurina. 4. Memória. 5. Neuroinflamação . I. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por me acompanhar constantemente, me abençoando e guiando.

Agradeço imensamente à minha mãe, Madalena Huf, e ao meu pai, Adilson Luiz Huf, que se fizeram presentes em todos os momentos da minha vida, me ensinaram a lutar pelos meus sonhos e nunca desistir, sempre com muito amor e carinho. Ao meu querido irmão, Adilson Huf, por nunca medir esforços para me ajudar e guiar.

Ao meu namorado, Anderson Spparrenberger Rolim, que me ensinou o verdadeiro significado do amor e do companheirismo, esteve ao meu lado a cada segundo desta caminhada, secou minhas lágrimas nos momentos difíceis, sorriu comigo a cada conquista, a cada experimento terminado, a cada resultado obtido. Sem você minha vida não teria cor, te amo. E a toda sua família, que já é minha também.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Marilda da Cruz Fernandes, pelos valiosos ensinamentos e pela confiança.

Ao meu coorientador, Dr. Jessié Martins Gutierres, por sempre estar presente ao meu lado, ajudando com seus conselhos, ensinamentos e histórias. Com muita alegria e paciência, soube me acalmar quando necessário.

Nesta caminhada, convivi com muitas pessoas, mas algumas delas me marcaram imensamente por sua força, garra, determinação e carinho, como minhas colegas Adriana Maria Zago, que não mediu esforços para me ajudar em tudo que estava ao seu alcance, e Gabrielle Nunes da Silva, que também trabalhou muito ao meu lado, para que tudo saísse perfeito, se dedicou ao meu experimento como se fosse o seu e ainda trouxe alegria aos dias difíceis e me ensinou muito.

Aos demais colegas do grupo de pesquisa, Francine Rahmeier, Marta Santin, Luiz Felipe Koenig, Anemará Girardon, pela paciência, ajuda e troca de experiência.

A todos os alunos de iniciação científica que estiveram comigo nesta jornada e que contribuíram de alguma forma para a obtenção destes resultados, em especial, a Fernanda da Silva e Rebeca Lobo de Freitas Pessanha.

Ao técnico do laboratório de pesquisa em patologia, Giuliano Rizzotto Guimarães, por todos os ensinamentos, por estar sempre disposto a ajudar e ensinar e por deixar os dias no laboratório mais leves e alegres. À técnica Teresinha Stein, pelos ensinamentos de vida e todo apoio.

Aos servidores do biotério de Experimentação da UFCSPA, pelo apoio durante os experimentos com animais.

Às minhas colegas de docência do Centro Universitário Cenecista de Osório (UNICNEC), em especial à sempre amiga e pesquisadora Carolina Beatriz Muller (*in memoriam*), que estão ao meu lado, me apoiando, incentivando com as palavras certas nas ocasiões certas.

Nunca esquecerei dessas pessoas maravilhosas que, nestes anos de convivência, me tornaram melhor e me fizeram uma pesquisadora, estarão sempre em meu coração. Obrigada!

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes.”

Isaac Newton

Resumo

Introdução: A doença de Alzheimer (DA), é uma patologia neurodegenerativa e irreversível que ocasiona declínio progressivo da memória e comprometimento cognitivo. A taurina é um aminoácido que está distribuído em vários tecidos corporais, com destaque para o cérebro, tem efeitos neuroprotetores. **Objetivos:** Verificar os efeitos da taurina sobre alterações comportamentais, de locomoção e memória, e na imunorreatividade de marcadores para neurônios, células gliais e receptor de insulina no hipocampo de animais expostos ao modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer com injeção de estreptozotocina intracerebroventricular (STZ-ICV). **Materiais e métodos:** Foram utilizados 40 ratos *Wistar* machos, a metade desses animais foi tratada por 25 dias com taurina, por via oral, uma vez ao dia, na dose de 100 mg/kg. No grupo controle, os animais receberam veículo (VE, solução salina). Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n = 10): I, veículo (VE); II, taurina 100 mg/kg (TAU), III, STZ (STZ, 3 mg/kg ICV) e IV, STZ + taurina 100 mg/kg (STZ + TAU). Os animais dos grupos III e IV receberam injeção ICV bilateral de STZ, enquanto os animais dos grupos I e II receberam apenas líquido cefalorraquidiano artificial. Após, os animais foram avaliados em tarefas comportamentais e eutanasiados por perfusão transcardíaca, e os cérebros fixados para a realização das técnicas de imunoperoxidase e imunofluorescência. **Resultados:** Verificou-se que a taurina foi capaz de melhorar a memória espacial e sensorial de longa e curta duração dos animais. Houve um efeito positivo da taurina sobre os receptores de insulina das regiões hipocampus. A taurina pode desenvolver um papel importante na sobrevivência e proteção de neurônios maduros, principalmente na região CA1 do hipocampo. Além disso, o tratamento reduziu a neuroinflamação hipocampal. **Conclusão:** A taurina possui efeitos

benéficos e importantes sobre o hipocampo de animais que receberam STZ-ICV, podendo ser usada como terapia complementar no tratamento da DA.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, estreptozotocina, taurina, memória espacial, memória sensorial/reconhecimento, neuroinflamação.

Abstract

Introduction: Alzheimer's disease (AD) is an irreversible neurodegenerative pathology that causes progressive memory decline and cognitive impairment. Taurine is an amino acid that is distributed in various body tissues, especially the brain, and has neuroprotective effects. **Objectives:** To verify the effects of taurine on behavioral changes, locomotion and memory, and on the immunoreactivity of markers for neurons, glial cells and insulin receptor in the hippocampus of animals exposed to the model of sporadic dementia of the Alzheimer type with injection of intracerebroventricular streptozotocin (STZ -ICV). **Materials and methods:** 40 male Wistar rats were used. Half of these animals were treated for 25 days with taurine, orally, once a day, at a dose of 100 mg/kg. In the control group, the animals received vehicle (VE, saline solution). The animals were divided into four experimental groups (n = 10): I, vehicle (VE); II, taurine 100 mg/kg (TAU), III, STZ (STZ, 3 mg/kg ICV) and IV, STZ + taurine 100 mg/kg (STZ + TAU). Animals in groups III and IV received bilateral ICV injection of STZ, while animals in groups I and II received only artificial cerebrospinal fluid. Afterwards, the animals were evaluated in behavioral tasks and euthanized by transcardiac perfusion, and the brains were fixed for immunoperoxidase and immunofluorescence techniques. **Results:** It was found that taurine was able to improve the short and long-term spatial and sensory memory of animals. There was a positive effect of taurine on insulin receptors in the hippocampal regions. Taurine may play an important role in the survival and protection of mature neurons, particularly in the CA1 region of the hippocampus. Furthermore, the treatment reduced hippocampal neuroinflammation. **Conclusion:** Taurine has beneficial and important effects on the hippocampus of animals that

received STZ-ICV, and it can be used as a complementary therapy in the treatment of AD.

Keywords: Alzheimer's disease, streptozotocin, taurine, spatial memory, sensory memory/recognition, neuroinflammation.

Lista de abreviaturas

Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima acetilcolinesterase
AICD C49-50	Domínio intracelular amiloide com fragmento carboxi-terminal de 49 a 50 resíduos
Aif 1	Fator inflamatório 1 do aloenxerto
Akt	Proteína quinase B
APO B100	Apolipoproteína B100
APOE4	Apoliproteína 4
APP	Proteína precursora amiloide
AS160	Substrato da Akt de 160kDa
ATP	Adenosina trifosfato
AVE	Acidente vascular encefálico
BHE	Barreira hematoencefálica
C83	Fragmento carboxi-terminal de 83 resíduos
C99	Fragmento carboxi-terminal de 99 resíduos
Ca ⁺²	Cálcio
CA1	Cornu Ammonis 1
CA2	Cornu Ammonis 2
CA3	Cornu Ammonis 3
CA4	Cornu Ammon 4
CAs	Cornu Ammonis
ChAT	Colina acetiltransferase
Cl ⁻	Cloro
CXCR7	Receptor de quimiocina 7
DA	Doença de Alzheimer
DETA	Demência esporádica do tipo Alzheimer
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E2	17β-estradiol
Erk	Quinases reguladas por sinal extracelular
EUA	Estados Unidos da América
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FI	Filamentos intermediários

FOXO	<i>Forkhead box</i>
G6P	Glicose-6-fosfato
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GD	Giro denteado
GDNF	Fator neutrófico derivado da glia
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GLUT1	Transportadora de glicose 1
GLUT2	Transportadora de glicose 2
GLUT3	Transportadora de glicose 3
GLUT4	Transportador de glicose 4
GPI	Glicofosfatidilinositol
Grb2	Proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 2
GSH	Glutathiona reduzida intracelular
GSK3	Glicogênio sintase quinase 3
GSK3 β	Glicogênio sintase quinase 3 beta
GSK-3-P	Glicogênio sintase quinase 3 fosforilada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HK	Hexoquinase
HOCl	Ácido hipocloroso
Iba-1	Proteína adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1
ICV	Intracerebroventricular
IFN- γ	Interferon γ
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IGF-1R	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Síntese de óxido nítrico induzível
IP	Intraperitoneal
IR	Receptor de Insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
IRS 1-4	Substrato do receptor de insulina 1 a 4
IV	Intravenosa

K ⁺	Potássio
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LPS	Lipopolissacarídeo
MEK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MFG8	Fator de crescimento epidérmico 8
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
Na ⁺	Sódio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NeuN	Proteína nuclear neuronal
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NGF	Fator de crescimento de nervo
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
P	Fosfato
p110	domínio catalítico
p3	Proteína extracelular
p85	Subunidade fosfatidilinositol 3-quinase
PAT1	Transportador próton-depende
PDK1	Proteína quinase 1 dependente de fosfoinositídeo
pH	potencial hidrogeniônico
PI3-K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PI3K/Akt	Fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase
PIP2	Fosfato ao fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PKC	Proteína quinase fosforilada
PSEN-1	Presenilina-1
PSEN-2	Presenilina-2
PTEN	Fosfatase homóloga à tensina
PTP	Proteínas tirosinas fosfatases
Raf	Proteína quinase Raf
RAGE	Receptor para a extremidade de glicação avançada
Ras	Proteína GTase
RI	Receptor de insulina
S100 β	Proteína β de ligação de cálcio

sAPP α	Ectodomínio N-terminal solúvel α da proteína precursora amiloide
sAPP β	Ectodomínio N-terminal solúvel β da proteína precursora amiloide
SGZ	Zona subgranular
SH2B2	<i>Adaptor protein 2</i>
Shc	Peptídeo homólogo de colágeno
SHIP2	Domínio SH2 contendo Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 5-fosfatase 2
SLC6A13	Transportadores de solutos 6 membrana 13
SLC6A6	Transportadores de solutos 6 membrana 6
SNC	Sistema nervoso central
SOS	<i>Son of sevenless</i>
SOX9	Fator de transcrição 9
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
STZ	Estreptozotocina
SVZ	Zona subventricular
Tau-P	Proteína tau fosforilada
TauT	Transportadores típicos de taurina
TGF	Fator transformador de crescimento
TGF β	Fator transformador de crescimento β
TK	Tirosina quinase
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TREM-2	<i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-2</i>
TrkB	Receptor de tropomiosina quinase B
tRNA	Ácido ribonucleico transportador
VRACs	Canais de ânion regulados por volume
β A	Peptídeo beta amiloide

Lista de Figuras

Figura 1. Localização anatômica e características estruturais do hipocampo	16
Figura 2. Circuito trissináptico do hipocampo	17
Figura 3. Consolidação da memória de longa duração.	19
Figura 4. Esquema da arena para realizar o teste de campo aberto.	21
Figura 5. Teste de reconhecimento de objetos em todas as suas etapas.	23
Figura 6. Teste do labirinto em Y.	24
Figura 7. Clivagem da APP por duas vias distintas.	30
Figura 8. Organização dos microtúbulos nos axônios neuronais.	31
Figura 9 . Diferentes fenótipos dos astrócitos e sua ação nos neurônios.	33
Figura 10. Fenótipos da micróglia, suas ações e produtos liberados.	34
Figura 11 . Via de sinalização da insulina no SNC.	37
Figura 12. Estrutura química do STZ.	39
Figura 13. Vias relacionadas à resistência cerebral de insulina com o uso de STZ.	41
Figura 14. Astrócitos e sua expressão de GFAP.	44
Figura 15. Ação do S100B via receptor RAGE nos astrócitos.	46
Figura 16. Ação das proteínas da família SOX no desenvolvimento de células do tecido nervoso.	49
Figura 17. Estrutura EF-hands de proteínas ligadoras de Cálcio.	50
Figura 18. Estrutura química da taurina.	53
Figura 19. Principal via de formação da taurina.	54
Figura 20. Ação da taurina no SNC.	59

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação das proteínas SOX	47
---	----

SUMÁRIO

1 REFERENCIAL TEÓRICO	15
1.1 HIPOCAMPO	15
1.2 MEMÓRIA.....	18
1.2.1 Análise de comportamento e memória	19
1.2.1.1 Teste de campo aberto	20
1.2.1.2 Teste de reconhecimento de objetos.....	22
1.2.1.3 Teste do labirinto em Y	23
1.3 TIPOLOGIAS DEMENCIAIS E A DOENÇA DE ALZHEIMER	24
1.4 GLIA E A DOENÇA DE ALZHEIMER.....	31
1.5 DOENÇA DE ALZHEIMER E A INSULINA.....	35
1.6 MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DA DEMÊNCIA ESPORÁDICA DO TIPO ALZHEIMER	38
1.7 ANTICORPOS DE DETECÇÃO POR IMUNORREATIVIDADE	41
1.7.1 Marcadores celulares associados aos astrócitos.....	42
1.7.1.1 GFAP	42
1.7.1.2 S100 β	44
1.7.1.3 SOX9	46
1.7.2 Iba-1 como marcador associado a micróglia	50
1.7.3 NeuN como marcador nuclear de neurônios maduros.....	51
1.8 TAURINA	53
1.8.1 Taurina e suas funções biológicas	56
REFERÊNCIAS	63
2 OBJETIVOS	77
2.1 OBJETIVO GERAL	77
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	77
3 ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	78
4 CONCLUSÕES.....	96
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
ANEXO – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFCSPA.....	98

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 HIPOCAMPO

O sistema límbico é a região responsável pelo comportamento emocional, incluindo impulsos motivacionais, atuando também na criação, armazenamento, evocação de memórias e aprendizado, e a principal estrutura de execução dessas funções é o hipocampo. O hipocampo está presente no encéfalo, circundando o ventrículo lateral do lobo temporal, é um arco orientado sagitalmente com um segmento anterior dilatado e um segmento posterior estreito. Nos adultos possui cerca de 4 a 5cm de comprimento e cerca de 1cm de largura (Figura 1) ^{1,2}.

Estruturalmente, o hipocampo é formado por lâminas celulares interligadas: o giro denteado (GD) e os *cornu Ammonis* (CAs), em que predominam células piramidais, e são subdivididos latero-medialmente em *cornu Ammonis* 1 (CA1), *cornu Ammonis* 2 (CA2), *cornu Ammonis* 3 (CA3) e *cornu Ammonis* 4 (CA4), definidas pelo tamanho, morfologia das células piramidais e pelas conexões realizadas em cada região. Nos CAs observa-se o corpo celular dos neurônios piramidais ocupando a região, enquanto os dendritos são extremamente ramificados e se estendem para fora ¹⁻⁴.

O GD, por sua vez, é formado por três porções:

I - Camada granular: formada por neurônios granulares, com corpo celular esférico, dendritos que surgem na parte apical e se direcionam para a camada molecular, em que recebem conexões sinápticas, e axônios, que partem do corpo celular em direção oposta dos dendritos, também chamados de fibras musgosas ¹⁻⁴.

II - Camada molecular: que recebe os dendritos das células granulares ¹⁻⁴.

III - Hilo: em que os axônios dos neurônios granulares fazem conexões com interneurônios ¹⁻⁴.

Além das funções características do sistema límbico, foi demonstrado que a região da zona subgranular (SGZ) do GD é um dos locais em que ocorre a neurogênese, ou seja, formação de novos neurônios no cérebro adulto. Esse fenômeno também pode ser observado na zona subventricular (SVZ) ao redor dos ventrículos laterais ²⁻⁵.

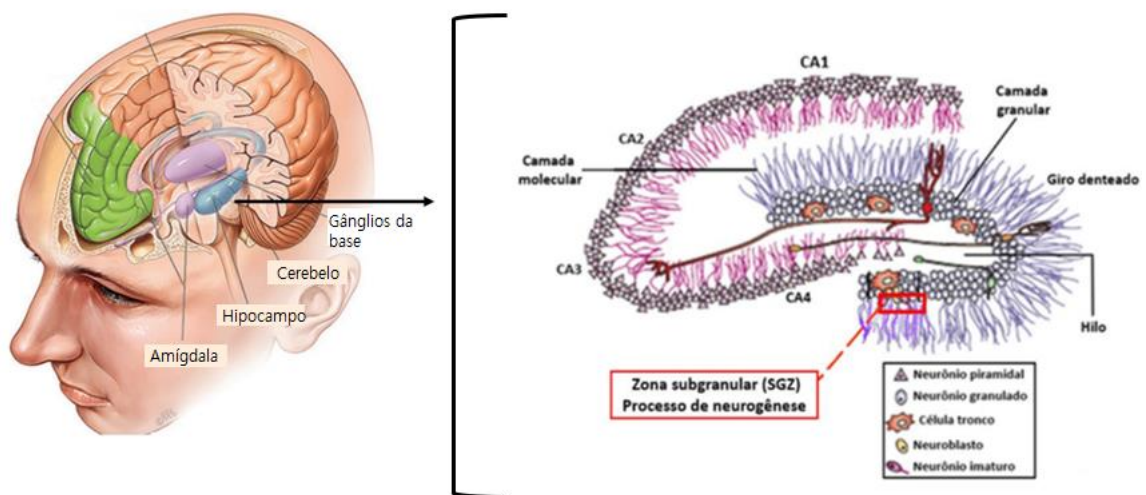


Figura 1. Localização anatômica e características estruturais do hipocampo
 Legenda: CA1: *cornu Ammonis* 1; CA2: *cornu Ammonis* 2; CA3: *cornu Ammonis* 3; CA4: *cornu Ammonis* 4 (Adaptado de Vescovi et al., 2006) ⁵.

Um dos circuitos intrínsecos mais importantes do hipocampo, associado com o processamento de informações, é o circuito trissináptico (Figura 2). Este é formado por axônios que partem do córtex entorrinal, enviando suas projeções para o GD, local em que ocorrem sinapses (sinapse 1) com as células granulares, que, por sua vez, projetam seus axônios, as fibras musgosas, para a região CA3, onde fazem conexão (sinapse 2) com as células piramidais. O CA3 fará conexão com a região CA1 (sinapse 3) por meio da via colateral de Schaffer. Por fim, as projeções de CA1

partem para o córtex entorrinal, que faz conexão nervosa com núcleos da amígdala, do *septum*, com o córtex pré-frontal ântero-lateral, com o córtex parietal associativo e com grande parte do córtex sensorial. Dessa forma, o CA1 está interligado a diversas regiões do cérebro ⁴.

Assim, acredita-se que esse circuito está intimamente relacionado com a formação e consolidação, principalmente da memória de longo prazo. As sinapses envolvendo a liberação e ligação de neurotransmissores, como a ligação do glutamato aos receptores metabotrópicos e aos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), promovem reações bioquímicas em cascata que auxiliam a formação da memória e a consolidação. Tais sinapses acontecem na região CA1 envolvida no circuito, visto que essa etapa é fundamental para tornar todas as memórias mais sólidas ^{6,7}.

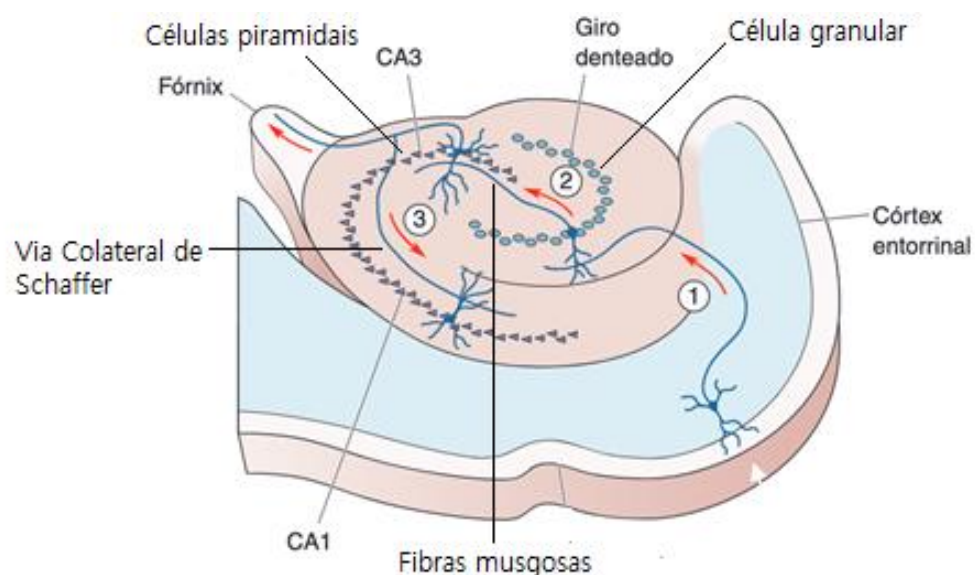


Figura 2. Circuito trissináptico do hipocampo

Legenda: 1: Conexão dos neurônios do córtex entorrinal com o giro denteado do hipocampo; 2: conexão dos neurônios do giro denteado com a região CA3; 3: conexão dos neurônios de CA3 com neurônios da região CA1. CA1 e CA3: Cornu de Ammonis 1 e 3 (Adaptado de Bear, 2017) ⁸.

1.2 MEMÓRIA

A memória pode ser definida como a habilidade de adquirir, armazenar e utilizar alguma informação sobre o ambiente. Juntamente com a aprendizagem são recursos cognitivos de extrema importância para os indivíduos ^{9,10}. A memória compreende vários processos, como aquisição, consolidação, retenção e evocação. A aquisição está relacionada com o momento em que se é exposto ao estímulo, quando são selecionadas as informações para serem guardadas. A consolidação é um processo mais duradouro, no qual as memórias são transformadas para um estado mais estável. Para isso, ocorre a participação de várias estruturas cerebrais, com intensa atividade metabólica celular, produção de muitas proteínas e favorecimento da plasticidade sináptica, que acontece aproximadamente de 3 a 4 horas após a aquisição ^{7,11,12}. Já a evocação está associada ao uso da memória anteriormente consolidada ^{7,12}.

De acordo com sua natureza, a memória pode ser classificada em: memória declarativa, também chamada de explícita, que se refere à capacidade de ter lembranças conscientes de significados semânticos, de fatos ou eventos, para pessoas, lugares e objetos, com envolvimento do lobo temporal medial e hipocampo. E em memória não declarativa, ou implícita, que é inconsciente e refere-se ao conjunto de habilidades motoras, hábitos, emoções, sentimentos e sensações ¹³.

Com base na memória explícita, pode-se classificar a memória ainda em episódica, associada a eventos específicos, com detalhes espaciais e temporais bem elucidados, como lembrar da última viagem de férias. E a memória semântica, que está associada a fatos, não havendo os detalhes espaciais e temporais, como saber a capital de um estado ¹⁴.

Já de acordo com a duração, a memória pode ser dividida em: memória de curta duração, que está relacionada a experiências e conhecimentos vividos recentemente e que terão um armazenamento por um período curto. A memória de trabalho que também é de curta duração e está envolvida com processos de armazenamento temporários de conhecimento declarativo, como manter números de telefone na memória durante a discagem. A memória de longa duração, que está associada com conhecimentos adquiridos há muito tempo, ou seja, há o armazenamento de muitas informações por um período indefinido. Para isso, faz-se necessário o processo de consolidação, que pode ocorrer com base em uma memória de curto prazo. Alternativamente o processo pode acontecer de maneira independente da memória de curta duração, ocorrendo com base em um estímulo sensorial (Figura 3) ^{10,15}.

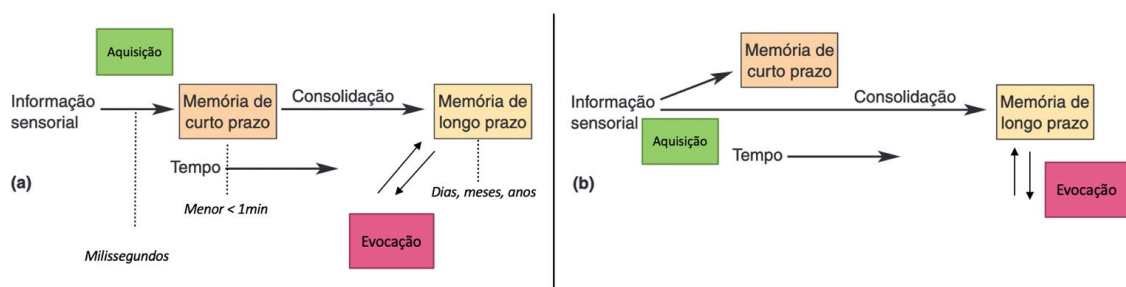


Figura 3. Consolidação da memória de longa duração.

(a): Memória consolidada com base na memória de curto prazo

(b): Memória consolidada sem a participação da memória de curto prazo, a partir da informação sensorial (Adaptado de Bear, 2017, e Izquierdo *et al.*, 2006) ^{7,8}.

1.2.1 Análise de comportamento e memória

Para entender os mecanismos e circuitos que fazem parte da memória, é necessário estudá-la também em modelos experimentais com animais. Para tanto, existem técnicas e protocolos experimentais desenvolvidos e já consolidados na

literatura. Alguns desses protocolos requerem reforços aversivos, como choque elétrico para condicionar o medo e levar ao aprendizado. Outros envolvem meio líquido ou recompensa alimentar. Neste caso a formação e a evocação da memória dependem de respostas que podem trazer desconforto para os animais. Também existem as técnicas que estão envolvidas com a tendência natural dos animais de explorarem o ambiente, como a exposição a um novo ambiente e a exposição de objetos com cores e formas diferentes. Essas tarefas são menos custosas e mais fáceis de serem empregadas e que deixam os animais mais confortáveis, eliminando o viés que pode ser gerado por um possível estresse, tornando o seu uso mais vantajoso ¹⁶.

1.2.1.1 Teste de campo aberto

O teste de campo aberto é um dos testes mais antigos para avaliar o comportamento de roedores e baseia-se na atividade de locomoção exploratória dos animais. Assim, os roedores são colocados em uma arena (que pode ser quadrada ou redonda), circundada por paredes, sem ter visão com o meio externo, com um piso dividido por quadrantes (Figura 4). O tempo de teste tem variações na literatura, mas a exploração de pelo menos cinco minutos no local é capaz de ser utilizada para avaliar a atividade locomotora gasta pelos animais. Avaliação ocorre quantificando-se a contagem do número de quadrantes que o animal percorre e o tempo gasto tanto no centro como na periferia do aparato ¹⁷.

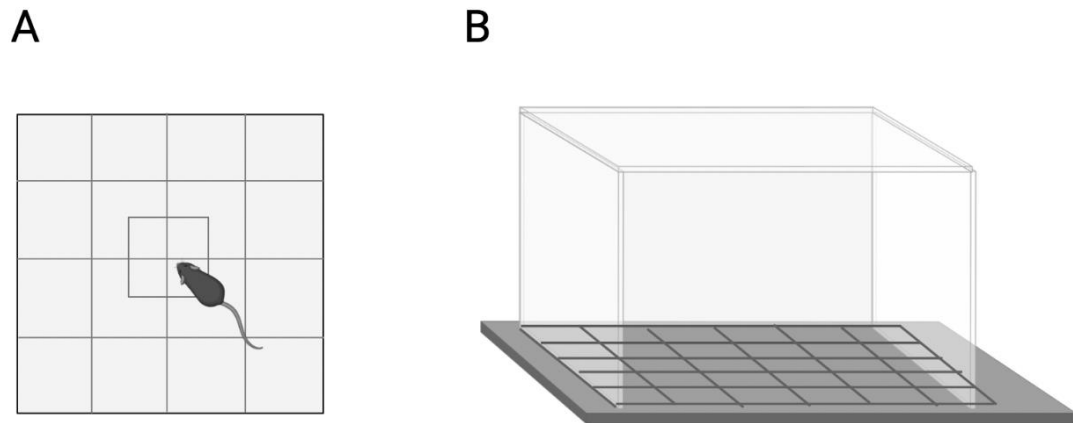


Figura 4. Esquema da arena para realizar o teste de campo aberto.

A: Visão da área do aparato; B: Visão tridimensional do aparato (Imagem da Autora, programa utilizado: BioRender 2023).

Essa tarefa é muito utilizada para avaliar o nível de excitabilidade do sistema nervoso central (SNC). A utilização de substâncias sedativas, por exemplo, pode reduzir a atividade locomotora dos animais, repercutindo no comportamento, enquanto que animais com maior atividade locomotora podem representar comportamentos excitatórios ¹⁷.

Cabe salientar que a tarefa do campo aberto também tem sido empregada na avaliação do estado de ansiedade de roedores, pois o ambiente novo e aberto gera um comportamento natural de insegurança e ansiedade no animal, sendo interessante para avaliar a capacidade ansiolítica de substâncias. Com a frequência com que o animal permaneceu nos quadrantes centrais e na periferia, o levantar do animal, quando ele se apoia nas patas traseiras e/ou quando coça o focinho e lambe fazendo a autolimpeza, pode revelar o comportamento de ansiedade e o estado emocional do roedor ¹⁷.

1.2.1.2 Teste de reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos é empregado para mimetizar a memória declarativa de humanos utilizando roedores, sendo possível mensurar tanto a memória de curta como a de longa duração. Esse teste baseia-se na tendência natural dos animais de explorar mais o objeto novo em relação ao familiar, em um contexto conhecido ¹⁸. O teste é dividido em três etapas, a primeira etapa é chamada de habituação, em que o animal é colocado em uma arena (a mesma utilizada para o teste de campo aberto) sem a presença de objetos e permanece explorando o ambiente por 5 minutos sendo retirado após este período; a segunda etapa, o treinamento dos animais ocorre 24 horas após a habituação, quando o animal retorna para a arena, porém agora há dois objetos idênticos para exploração durante o mesmo período e após removido da arena. Na etapa seguinte, a terceira, os roedores estão aptos para realizar o teste propriamente dito. Se for avaliada a memória de curta duração, ele retornará para o aparato 4 horas após o treino. Nessa ocasião, terá um objeto idêntico ao presente no treino (objeto A) e um segundo objeto diferente (objeto B). Para avaliar a memória de longa duração, o roedor retornará à arena 24h depois do treino e lá terá o objeto A e um novo objeto diferente dos demais (objeto C) como mostrado na figura 5 ¹⁸.

A memória será avaliada comparando o tempo explorando o objeto já conhecido em relação ao tempo explorando o objeto novo, lembrando que os objetos são posicionados em dois lados adjacentes e, quando substituídos, são colocados sempre na mesma posição. Cabe salientar que explorar para o analisador é considerado quando o animal toca o nariz e/ou patas ou chega perto do objeto a uma distância de menos de 2 cm ¹⁸.

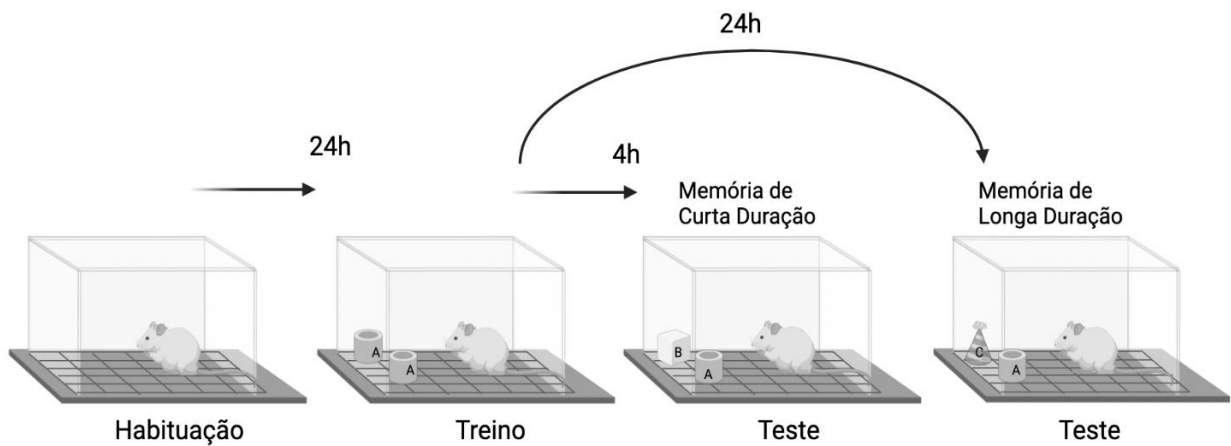


Figura 5. Teste de reconhecimento de objetos em todas as suas etapas. (Imagem da Autora, programa utilizado: BioRender 2023 com adaptação de Brodziak, Kolat, Rózyk-Myrta, 2014) ¹⁹.

1.2.1.3 Teste do labirinto em Y

O teste do labirinto em Y (ou pode ser em forma de T) é utilizado para avaliar a memória espacial dos animais. O aparato é composto por três braços com aproximadamente 25cm de comprimento, 14cm de altura e 5cm de largura. Para realizar o teste, o animal vai passar por um processo de treinamento, em que será colocado em um dos braços (braço inicial) e terá livre acesso para explorar o aparato por 5 minutos e será retirado. Nesse momento, um dos braços terá o acesso fechado (braço novo), restando dois braços para a exploração. No momento do teste, o animal retorna ao aparato e agora os três braços terão livre acesso para exploração (Figura 6) ^{20,21}.

Assim, é determinado o número total de entradas no braço novo. Com isso, uma alta taxa de entrada no braço novo indica que o animal pode lembrar em qual braço entrou por último e explorou mais o braço que é novidade no ambiente já conhecido ^{20,21}.

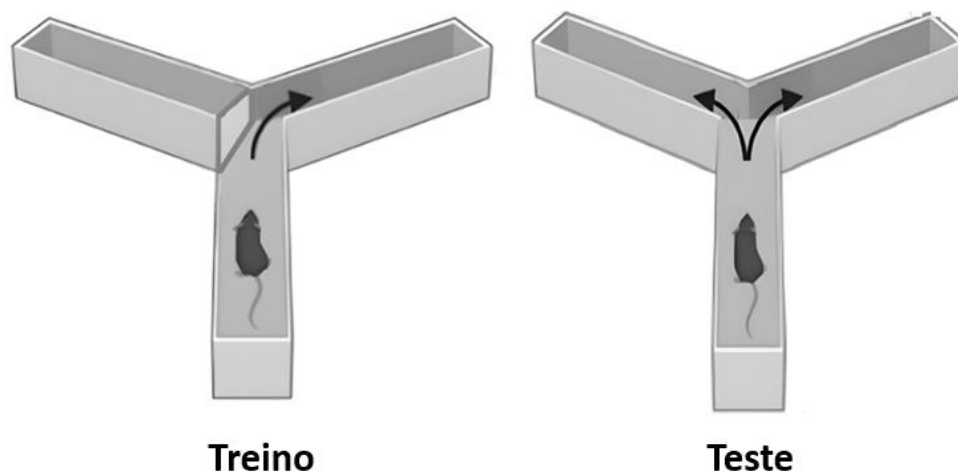


Figura 6. Teste do labirinto em Y.

Treino e teste (Imagem da Autora, programa utilizado: BioRender 2023 com adaptação de Brodziak, Kolat e Rózyk-Myrta, 2014) ¹⁹.

1.3 TIPOLOGIAS DEMENCIAIS E A DOENÇA DE ALZHEIMER

A demência é uma síndrome: grupo de sinais e sintomas concomitantes, resultante de doenças crônicas e progressivas no cérebro, em que ocorre comprometimento de funções corticais superiores, como memória, pensamento, compreensão, capacidade de aprender, linguagem, julgamento, associado a mudanças no controle emocional, comportamento social ou motivacional, o que deixa o indivíduo incapaz de realizar tarefas corriqueiras ^{22,23}. A idade média de início é por volta dos 65 anos e, depois dessa idade, a prevalência para o desenvolvimento da demência dobra a cada 5 anos, sendo a principal causa de incapacidade em idades mais avançadas. Globalmente, estima-se que cerca de 7% dos indivíduos acima de 65 anos estão com algum tipo de demência, e esse número aumenta quando se trata de países desenvolvidos, devido a uma expectativa de vida mais longa ²³.

Entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento de demências pode-se citar: idade avançada, perfil genético, histórico de doença vascular sistêmica e estilo de vida. A maioria dos casos estão associados a um grau de neurodegeneração ²³. Existem diferentes tipos de demência, como a doença de Alzheimer (DA), a demência vascular, a demência por corpúsculos de Lewy, a frontotemporal, entre outras ^{23,24}.

A demência vascular está associada a uma doença cerebrovascular, como responsável pelo quadro demencial, ou seja, ocorre uma lesão encefálica devido a dano isquêmico. É considerada a segunda maior causa de demência e representa 20-30% dos casos. Observa-se principalmente alterações do tipo córtico-subcortical, que resulta em sintomas iniciais, como déficits nas funções executivas ou focais. A memória não está tão afetada como acontece na DA. As alterações de humor são mais frequentes associadas a uma grande fragilidade física ^{22,24}.

Esse tipo de demência acomete pacientes acima de 40 anos e tem como principal fator de risco a presença de alterações vasculares, como hipertensão, arritmias, infarto do miocárdio, doença vascular periférica e também alterações lipídicas, diabetes melito, vasculites autoimunes e tabagismo, pois a causa está associada a infarto cerebral. Assim, a apresentação clínica também vai variar de acordo com o local desse infarto. Além disso, podem ocorrer múltiplos infartos de maneira difusa ²⁴.

A demência vascular se desenvolve em cerca de 15 a 30% dos indivíduos em torno de três meses após em acidente vascular encefálico (AVE), mas também pode ocorrer de maneira tardia, muito tempo após a alteração vascular em 20 a 25% dos casos ²⁵.

A demência por corpúsculos de Lewy é caracterizada por ter um início rápido e declínio progressivo, e as principais alterações cognitivas são na fluência verbal, nas atividades audiovisuais com a presença de alucinações e sintomas psicóticos ^{24,26}.

Os corpúsculos de Lewy são inclusões eosinofílicas e hialinas presentes no citoplasma de células nervosas, compostos sobretudo de α -sinucleína e ubiquitina, encontrados principalmente na região do neocórtex, prosencéfalo, no tronco encefálico e em outras partes do sistema nervoso. Associados a placas senis e em menor quantidade aos emaranhados neurofibrilares e degeneração de neurônios dopaminérgicos são as características patogênicas desse tipo de demência ^{24,26}. Acometem cerca de 10 a 20% dos pacientes com quadro demencial. Além das alterações cognitivas já mencionadas, observam-se também sintomas motores, como quedas, disfunção autonômica, tremor e rigidez muscular, o parkinsonismo, que geralmente é bilateral ²⁶.

A demência frontotemporal se caracteriza por alterações importantes nas regiões frontais e temporais com atrofia nesses locais, o que leva a alterações cognitivas progressivas no comportamento, linguagem e personalidade. Representa em torno de 10 a 15% dos casos de demência com início após 40 anos de idade, e a sobrevida está estimada em cerca de 6 a 11 anos desde o início dos sintomas ^{24,27}.

Nessa demência observam-se síndromes clínicas distintas, uma delas chamada de variante comportamental, a mais comum, em que se destacam anormalidades comportamentais, como desinibição, apatia, perda de empatia, comportamento estereotipado ou compulsivo. A segunda é a variante afasia progressiva não fluente associada a déficits motores e na fala. A terceira síndrome, a afasia progressiva primária semântica, envolve a alteração no conhecimento relacionada a objetos e palavras ²⁷.

A DA, que representa cerca de 60% a 80% dos casos de demência na população. Foi diagnosticada pela primeira vez em 1906, por Alois Alzheimer, que relatou o caso de uma mulher de 51 anos com alterações cognitivas, desorientação, delírios e importantes alterações comportamentais. No *post mortem*, a avaliação do tecido nervoso dessa paciente revelou atrofia cerebral, emaranhados fibrilares, perda neuronal e deposição, especialmente no córtex, de uma substância ²⁸.

Atualmente, a DA pode ser definida como uma doença neurodegenerativa, irreversível com aspectos neuropatológicos bem estabelecidos, como o surgimento das placas beta amiloides, emaranhados neurofibrilares, associado à astrogliose e à ativação microglial, o que gera perda progressiva de memória, alterações comportamentais e cognitivas importantes, impedindo o indivíduo de realizar tarefas rotineiras ²⁹.

A DA é considerada um problema de saúde pública. Na população americana, estima-se que, de cada dez pessoas com mais de 65 anos, uma tenha DA. O custo anual da doença nos Estados Unidos da América (EUA) pode chegar a 600 bilhões. Já na Inglaterra essa demência foi a principal causa de morte registrada no ano de 2015 ³⁰. A doença pode atingir mais de 80 milhões de pessoas no ano 2040 e, no Brasil, 13% da população acima de 65 anos foi diagnosticada com DA em 2020 ³¹.

A progressão da DA envolve fases amplas, como fase pré-clínica, em que os indivíduos têm alterações cerebrais e marcadores que indicam a doença, mas ainda não têm sintomas associados, como as alterações de memória e cognição; fase de comprometimento cognitivo leve, em que o indivíduo terá evidências cerebrais e biomarcadores para a doença, junto com pequenas alterações na memória e cognição, geralmente observadas por pessoas próximas, mas tais alterações não impedem que ele realize tarefas corriqueiras ³².

Há também a fase de demência, em que as alterações de memória, cognição e comportamento prejudicam as atividades corriqueiras do indivíduo. Assim, ao longo do tempo, os sintomas vão se alterando, refletindo o grau das alterações nas células nervosas. O ritmo em que eles acontecem é variável de pessoa para pessoa e pode ser leve, moderado ou severo ³².

Quando os sintomas são leves, os indivíduos ainda têm um pouco de independência e realizam algumas tarefas sozinhos. Quando são moderados, há dificuldade de comunicação, de realizar tarefas corriqueiras, mudanças de personalidade e comportamento. Na formas severas, os pacientes ficam com um comprometimento cerebral muito importante, tornam-se acamados, com problemas de deglutição, incontinência urinária e fecal e em outros órgãos ³².

Além disso, a DA pode apresentar-se na forma precoce ou familiar, mais rara e responsável por 5% dos casos com manifestação antes dos 65 anos. Nestes casos a causa é basicamente genética, com mutações autossômicas dominantes em genes, como o gene da APP, no cromossomo 21, gene presenilina-1 (PSEN-1), localizado no cromossomo 14, e o gene presenilina-2 (PSEN-2), no cromossomo 1, que seriam responsáveis por mudanças na produção e processamento do peptídeo beta amiloide (β A), promovendo a patogenia da doença ^{33,34}.

Já a forma tardia ou idiopática, que representa a maioria dos casos da doença, é um distúrbio complexo que se correlaciona com a idade, e geralmente acomete pacientes acima dos 65 anos, tem etiologia heterogênea e com relação genética ³³.

A apolipoproteína E (APOE), envolvida com o transporte e metabolismo de lipídios, também tem uma relação genética com a DA. A presença de alguns alelos da proteína são fatores de risco para o desenvolvimento da doença. O alelo 4

aumenta o risco da doença e diminui a idade de apresentação, podendo estar presente nas duas formas comentadas ³³.

Com relação às alterações genéticas, um gene associado ao déficit cognitivo é o *Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-2* (TREM-2), que produz uma variante a R67H, modifica sua ação neuroprotetora e faz com que o indivíduo acometido por essa variante tenha três vezes mais risco de desenvolver a DA. Além disso, fatores ambientais que levam às mudanças fenotípicas também podem estar relacionados com a DA, classificada com etiologia multifatorial ³¹.

A patogenia da DA é associada às placas beta amiloides, que são provenientes da deposição extracelular do β A, que contém 40 a 42 aminoácidos agregados, que se originam do metabolismo da proteína precursora amiloide (APP), após sua clivagem pelas enzimas secretases em neurônios ²⁹. A APP é um tipo de proteína transmembrana presente em várias células. No sistema nervoso, ela sofre clivagens sequenciais por vias diferentes: uma via de ação fisiológica, quando ocorre a atuação das α secretases, e outra via por meio da clivagem por β secretases, que irá gerar um produto extracelular de 99 aminoácidos, que é clivado novamente por uma γ secretase, gerando os β A. O surgimento de várias dessas estruturas fibrilares gera as placas beta amiloides (Figura 7). Com o aparecimento das placas, há um comprometimento importante dos neurônios, que sofrem alterações na fenda pré-sináptica e também nos botões de seus axônios terminais, além de gerar estresse oxidativo, disfunções mitocondriais e perda de espinhos dendríticos ³⁵.

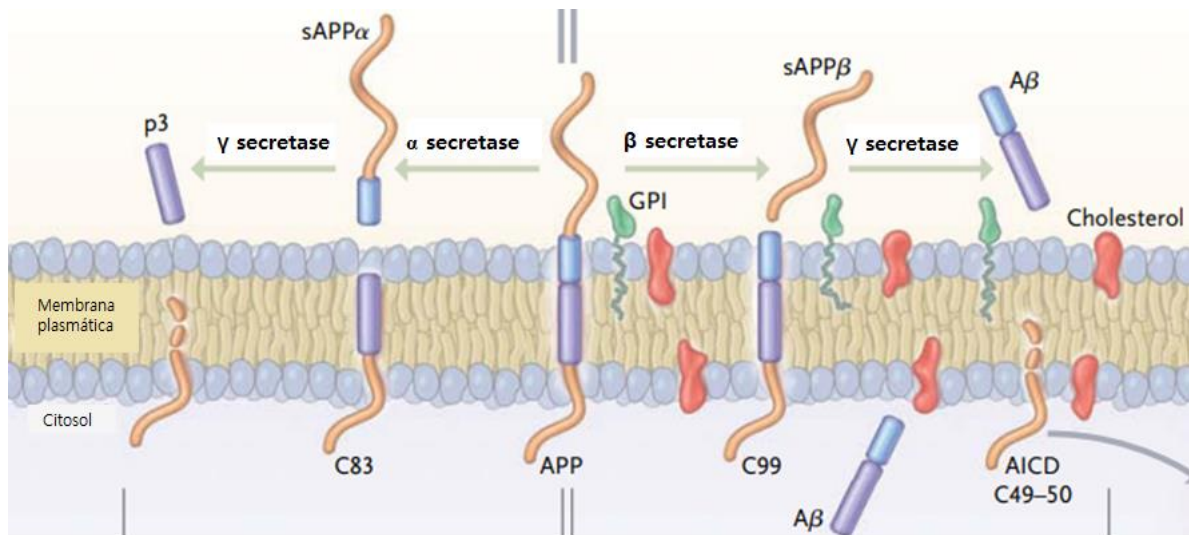


Figura 7. Clivagem da APP por duas vias distintas.

Legenda: A β : peptídeo β -amiloide; AICD C49-50: domínio intracelular amiloide com fragmento carboxi-terminal de 49 a 50 resíduos; APP: proteína precursora amiloide; C83: fragmento carboxi-terminal de 83 resíduos; C99: fragmento carboxi-terminal de 99 resíduos; GPI: glicofosfatidilinositol p3: proteína extracelular; sAPP α : ectodomínio N-terminal solúvel α da proteína precursora amiloide; sAPP β : ectodomínio N-terminal solúvel β da proteína precursora amiloide (Adaptado de Querfurth e Laferla, 2010) ³⁶.

Já os emaranhados neurofibrilares, que também fazem parte da patogenia da DA, estão presentes no interior dos neurônios, constituídos principalmente pela proteína tau aberrantemente dobrada e hiperfosforilada ³⁷. A proteína tau está associada com a formação de microtúbulos nos neurônios. Logo, é responsável pela montagem dos microtúbulos, bem como a estabilidade deles já formados, o que é de extrema importância para o transporte axonal nos neurônios. Quando hiperfosforilada, a tau é insolúvel, não tem afinidade por microtúbulos, desprende-se e se torna filamentos helicoidais (Figura 8) ³⁸. A proteína tau anormalmente fosforilada pode afetar compartimentos pré e pós-sinápticos, prejudicando cascatas de sinalização e transporte axonal, o que leva a processos de morte celular ³⁷.

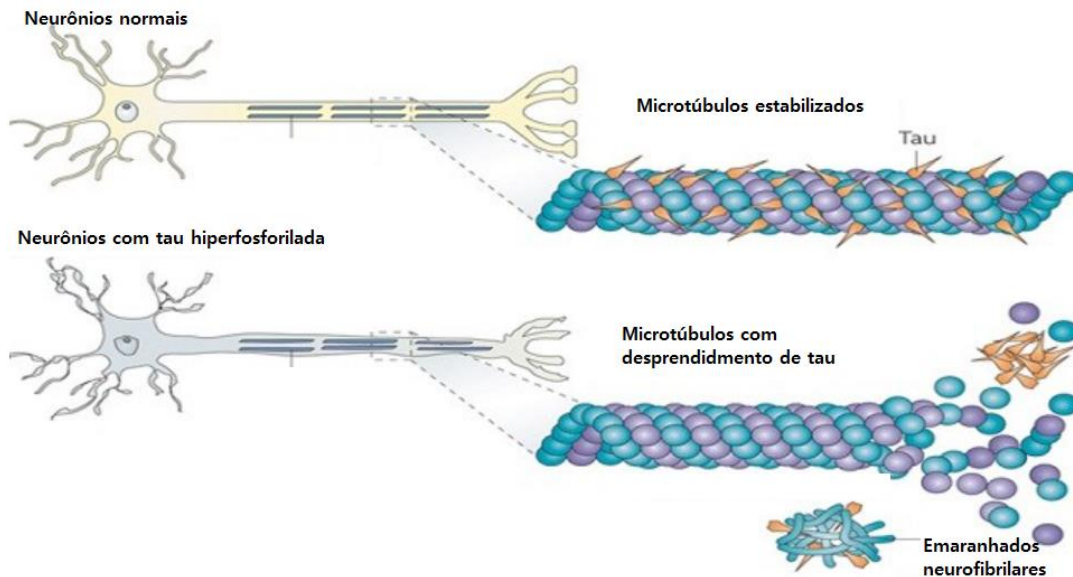


Figura 8. Organização dos microtúbulos nos axônios neuronais.
(Adaptado de Brunden, Trojanowski e Lee, 2009) ³⁹

1.4 GLIA E A DOENÇA DE ALZHEIMER

A participação da glia no processo de neurodegeneração característico da DA tem sido apontada como relevante. As células gliais em forma de “estrela”, chamadas de astrócitos, são muito versáteis e estão envolvidas na DA. Os astrócitos possuem inúmeros prolongamentos citoplasmáticos que fazem contato com sinapses em diferentes regiões do sistema nervoso. Seus prolongamentos também entram em contato com vasos sanguíneos, dando suporte bioquímico às células que formam a barreira hematoencefálica (BHE). Estas expressam receptores para muitos neurotransmissores, demonstrando papel ativo para a formação de sinapses: controlando, regulando e integrando inúmeros processos envolvendo glia e neurônio e, por fim, fazem a manutenção de íons extracelulares ^{40,41}.

Sabe-se que, quando há injúria no tecido nervoso, a população de astrócitos torna-se reativa, e há maior expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) no citoesqueleto dos astrócitos, com hipertrofia do corpo celular e produção de

inúmeras citocinas. A astrogliose reativa em relação à expressão de genes pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios está associada à formação de fenótipos diferentes de astrócitos, o fenótipo A1 e A2. O fenótipo A1 expressa vários genes com potencial destrutivo para sinapses, sendo associado à liberação de citocinas pró-inflamatórias. Já o fenótipo A2 expressa fatores neurotróficos e secretam proteínas que promovem sinaptogênese, mostrando funções reparadoras e neuroprotetoras, fenótipo anti-inflamatório (Figura 9) ^{41,42}.

Kraft *et al.* (2013) mostraram em seu estudo que a reatividade astrogliar na DA leva à formação de cicatrizes astrogliais. Ou seja, há um espessamento do soma celular, e os astrócitos conseguem assim sustentar e dar suporte para uma maior área neuronal, tendo um efeito benéfico para o tecido. Esses astrócitos apresentariam fenótipo A2 ⁴³. Por outro lado, na DA, já foi observado o fenótipo A1 dos astrócitos, em que liberam uma gama de citocinas, interleucinas, óxido nítrico (NO) e outras moléculas citotóxicas, exacerbando assim a neuroinflamação ⁴⁴.

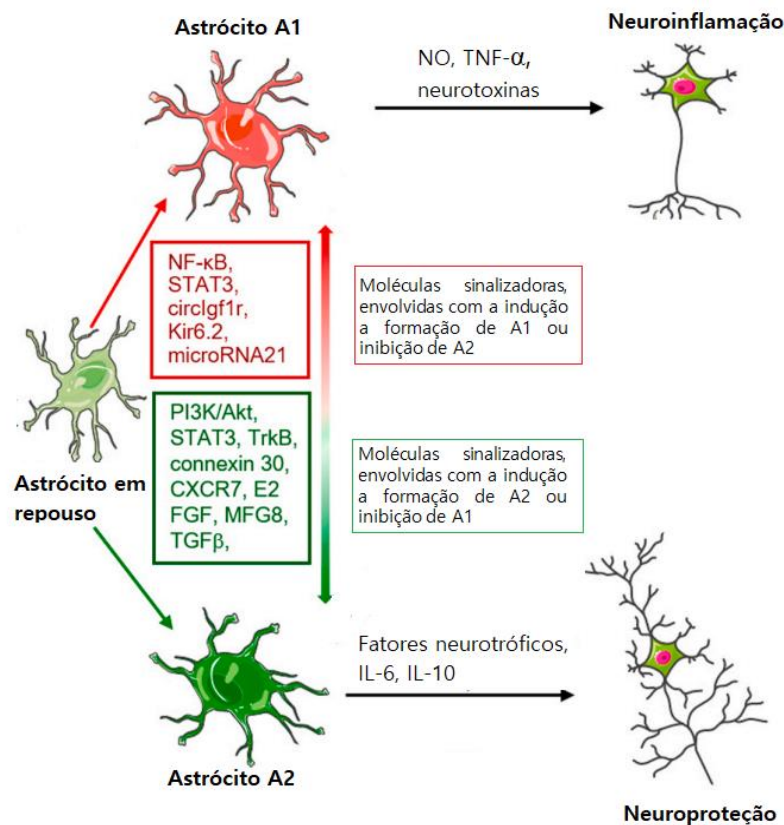


Figura 9 . Diferentes fenótipos dos astrócitos e sua ação nos neurônios.

Legenda: NF- κ B: fator nuclear kappa-B; STAT3: transdutor de sinal e ativador da transcrição3; PI3K/Akt: fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B; TrkB: receptor de tropomiosina quinase B; CXCR7: receptor de quimiocina 7; E2: 17 β -estradiol; FGF: fator de crescimento de fibroblastos; MFG8: fator de crescimento epidérmico 8; TGF β : fator transformador de crescimento- β .

(Adaptado de Fan e Huo, 2021) ⁴⁵.

Outro aspecto relevante para a DA são as respostas microgliais associadas à doença. A micróglia, conhecida como as células imunológicas do tecido nervoso, é responsável pela fagocitose, entre outras funções. Apresenta prolongamentos altamente ramificados, que interagem com uma gama de neurônios e até mesmo podem induzir a apoptose neuronal. É o primeiro tipo de célula a responder a um insulto na região, o que faz com que a ativação microglial seja comum em neuropatologias e em doenças neurodegenerativas, como a DA. Acredita-se que a micróglia é capaz de ser atraída pelas placas β A, sendo que a ativação microglial libera mediadores que levam à ativação astrocitária ^{42,46}. Assim como os astrócitos, a micróglia também possui

dois fenótipos: M1, relacionado às atividades pró-inflamatórias, com ativação associada à liberação de citocinas como fator de necrose tumoral α (TNF α) e interleucinas, com atividade fagocitária prejudicada, e o M2, associado às atividades anti-inflamatórias, com ação fagocitária intensa (Figura 10) ⁴⁷.

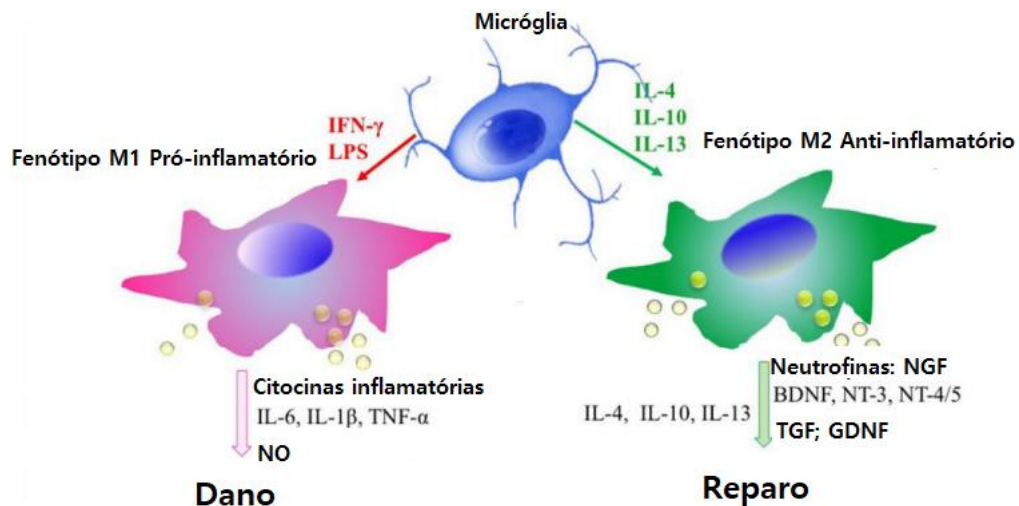


Figura 10. Fenótipos da micróglia, suas ações e produtos liberados.

Legenda: GDNF: fator neutrótico derivado da glia IFN- γ : Interferon γ ; IL-6 e IL-1 β : Interleucinas 6 e 1 β ; IL-4, IL-10, IL-13: Interleucinas 4, 10 e 13; LPS: Lipolissacarídeo; NGF: fator de crescimento de nervo; TGF: fator transformador de crescimento (Adaptado Fan, Xie e Chung, 2017) ⁴⁸.

A micróglia interage diretamente com a astroglia por meio da liberação de sinalizadores. Alguns autores propõem que a micróglia pode estimular o fenótipo dos astrócitos, quando libera citocinas pró-inflamatórias a astroglia torna-se reativa tipo A1, sendo prejudicial ao tecido. Os astrócitos interagem com a micróglia e podem modular sua atividade. A interação astrócitos e micróglia desempenha um papel importante na formação de diversas neuropatologias, alterando a ativação microglial, migração e fagocitose ⁴².

Além dessa cascata patogênica associada à neuroinflamação, a DA conta com uma teoria colinérgica importante. A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor que tem

atividade excitatória e é utilizada por todos os neurônios colinérgicos. Sua produção se dá no interior desses neurônios a partir da ação da enzima colina acetiltransferase (ChAT), tendo como base para a reação as moléculas de colina, que serão acetiladas, e acetil-coenzima A (Acetil-CoA) que será a doadora do grupo acetil ^{49,50}.

A ACh desempenha um papel importante na formação da memória, os neurônios colinérgicos inervam densamente o hipocampo, e o comprometimento do sistema colinérgico se manifesta em pacientes com DA. Nesse sentido, estudos mostram a atrofia colinérgica no prosencéfalo basal (principal entrada de neurônios colinérgicos para o hipocampo) de pacientes com a doença precoce ou em indivíduos com alto risco de desenvolvê-la, sendo que pode ocorrer uma diminuição no número de neurônios colinérgicos, mas também nos níveis de ChAT nesses indivíduos ^{51,52}.

A elevação dos níveis de ACh, por meio do bloqueio de acetilcolinesterase (AChE), enzima que promove a hidrólise de ACh na fenda sináptica, é um método frequentemente usado para tratar pacientes com DA ⁵³.

1.5 DOENÇA DE ALZHEIMER E A INSULINA

A insulina, hormônio peptídico secretado pelas células β pancreáticas, é conhecido por regular o metabolismo da glicose nos tecidos periféricos, ou seja, neutraliza o aumento dos níveis de glicose no sangue, impedindo a hiperglicemia. No sistema nervoso central (SNC), não é diferente, sendo essencial para a sobrevivência neuronal. Além disso, a insulina participa da plasticidade sináptica, transmissão sináptica, dos processos de neurogênese, lembrando que a glicose é a principal fonte de energia das células nervosas ⁵⁴.

A maior parte desse hormônio presente no SNC é proveniente da periferia. Após a produção pelo pâncreas, a insulina é transportada por um transportador específico via BHE, chegando às células nervosas, e uma pequena porção de insulina é produzida pelos próprios neurônios ⁵⁵⁻⁵⁷.

A insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) exercem seus papéis se ligando aos seus receptores específicos, os receptores de insulina (IR) e o receptor de IGF-1 (IGF-1R), que estão amplamente distribuídos nas diferentes células do tecido nervoso em locais como o bulbo olfatório, o hipotálamo, o córtex cerebral, o cerebelo e o hipocampo. Percebe-se, assim, a importância desse hormônio, já que alterações na sinalização de insulina na região podem acelerar o envelhecimento cerebral, afetar a plasticidade neuronal e participar de processos de neurodegeneração ⁵⁸.

O IR é formado por quatro subunidades: duas α subunidades, que são extracelulares, e duas β subunidades, que são intracelulares e se unem por ligações dissulfetos para formar um tetrâmero, encontrado principalmente na membrana plasmática das células (Figura 11A) ^{55,59}.

A ligação da insulina com as subunidades extracelulares do IR leva à fosforilação das subunidades intracelulares, ativando tirosina quinase e recrutando importantes proteínas, como o substrato do receptor de insulina 1 a 4 (IRS 1-4). As proteínas IRS 1-4 são fosforiladas em tirosinas, recrutando p85, que é uma subunidade fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K) que irá se ligar aos IRS 1-4, ativando um domínio catalítico p110 que catalisa a adição de um grupo fosfato ao fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), convertendo-o em fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). O PIP3 pode ser degradado por fosfatase homóloga à tensina (PTEN) e pela enzima domínio SH2, contendo Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 5-fosfatase 2 (SHIP2) ^{55,57,59}.

A PIP3, por sua vez, ativa a proteína quinase 1 dependente de fosfoinosítídeo (PDK1), que fosforila e ativa a proteína quinase b (Akt), que está envolvida na maioria dos eventos metabólicos da insulina, como a captação de glicose via transportador de glicose 4 (GLUT4). Também é capaz de inativar a via glicogênio sintase quinase 3 (GSK3), fosforilando-a, além de atuar modulando a plasticidade sináptica, polaridade neuronal, neurotransmissão. Além disso, outra cascata é ativada quando ocorre a interação da insulina com seu receptor, a cascata da proteína quinase é ativada por mitógeno (MEK), induzindo a expressão gênica, proliferação, regeneração e reparo neuronal (Figura 11B) ^{55-57,60}.

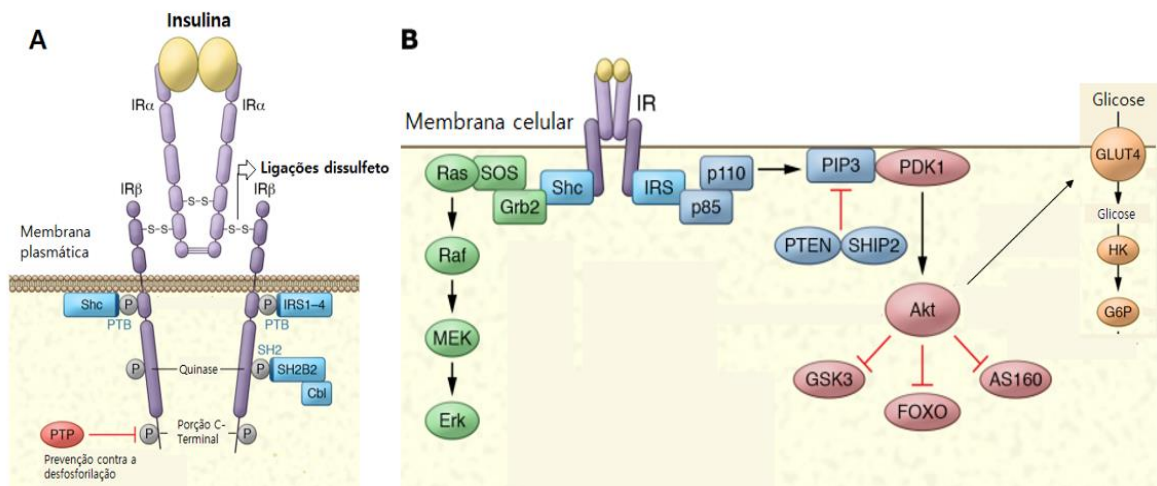


Figura 11 . Via de sinalização da insulina no SNC.

Legenda: A: Estrutura do receptor de insulina; IR α : Receptor de insulina alfa; IR β : Receptor de insulina beta; IRS1-4: Substrato do receptor de insulina 1 – 4; P: fosfato; PTP: Proteínas tirosinas fosfatases; SH2B2: *Adaptor Protein 2*; Shc: Peptídeo homólogo de colágeno.

B: Sinalização da insulina no SNC; Akt: proteína quinase b; AS160: Substrato da Akt de 160 kDa; Erk: quinases reguladas por sinal extracelular; FOXO: *Forkhead box*; G6P: Glicose -6-fosfato; GLUT4: transportador de glicose 4; GSK3: glicogênio sintase quinase 3; Grb2: Proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 2; HK: Hexoquinase; IRS: Substrato do receptor de insulina; MEK: proteína quinase ativada por mitógeno; p85: subunidade fosfatidilinositol 3-quinase; p110: domínio catalítico; PDK1: proteína quinase-1 dependente de fosfoinosítídeo; PIP3: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato; PTEN: fosfatase homóloga à tensina; Raf: proteína quinase Raf; Ras: pequena GTase; SHIP2: domínio SH2 contendo fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 5-fosfatase 2; SOS: *son of sevenless*.

(Adaptado de Saltiel, 2021) ⁵⁹.

Na DA, há uma falha nas células nervosas em responder à insulina, atribuída a deficiência e/ou resistência a esse hormônio pancreático. Isso ocorre, por exemplo, quando há uma desregulação nos receptores de insulina, que se tornam incapazes de se ligarem a ela. Isso resulta em comprometimento da neuroplasticidade, ou até mesmo um comprometimento na liberação de neurotransmissores, ocasionando alterações de cognição e humor, sugerindo que a DA é uma espécie de diabetes mellitus tipo 3 ^{54,58}.

A disfunção da via de sinalização da insulina PI3-K leva à resistência à insulina e também já foi associada à hiperfosforilação da proteína tau, pois ativa a GSK-3, contribuindo para a formação dos emaranhados neurofibrilares. O estresse oxidativo também ativa a via GSK-3, que é consequência da resistência à insulina ⁶¹. A insulina também está envolvida na via fisiológica de quebra da APP, estimulando a via. Portanto, o comprometimento da sinalização de insulina pode resultar no estímulo da outra via (via das β secretases) de quebra da APP, que resulta na formação das placas amiloides ^{58,61}.

1.6 MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DA DEMÊNCIA ESPORÁDICA DO TIPO ALZHEIMER

A estreptozotocina (STZ) é uma molécula proveniente de bactérias ambientais. Quimicamente, apresenta-se como glucosamina-nitrosourea, que foi isolada com o intuito de ser um antibiótico e agente anticancerígeno. Porém observou-se que ela é capaz de ser captada pela proteína transportadora de glicose 2 (GLUT2), presente nas membranas celulares. No interior das células que possuem esse transportador, a STZ age provocando alquilação do ácido desoxirribonucleico (DNA). Como consequência, a célula ativa uma via de reparo de DNA, que gasta

energia na forma de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e adenosina trifosfato (ATP), resultando em necrose celular ^{62,63}.

A GLUT2 está presente nas células do pâncreas, principalmente nas células beta pancreáticas, produtoras de insulina. Com isso, o uso de STZ prejudica a produção de insulina. Essa proteína transportadora de glicose se encontra em outros órgãos, como fígado e rins, assim a administração intraperitoneal (IP) ou intravenosa (IV) de STZ é considerada modelo animal para diabetes do tipo I ou II, dependendo da dose. Como a BHE não possui receptores GLUT2, o STZ não exerce efeitos diretos sobre o SNC, quando administrado dessa forma ⁶²⁻⁶⁴.

A injeção intracerebroventricular (ICV) de doses pequenas de STZ altera o metabolismo cerebral da glicose, o que está de acordo com a resistência à insulina presente nos pacientes com DA, sendo então um modelo não transgênico proposto para a doença. O mecanismo de ação da STZ no tecido nervoso parece estar também envolvido com sua atuação nos receptores GLUT2, já que eles foram encontrados em neurônios. Além disso, a estrutura química (Figura 12) da STZ sugere que esse composto leva ao surgimento de radicais livres, NO e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ^{63,64}.

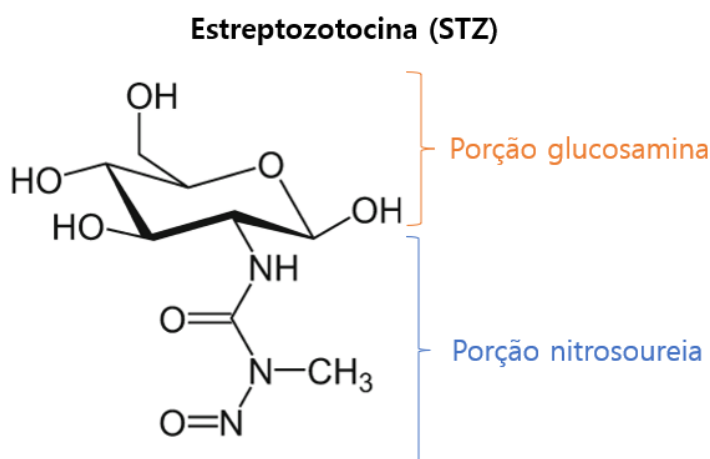


Figura 12. Estrutura química do STZ.
(Adaptado de Grieb, 2016) ⁶³.

A partir das primeiras publicações, por volta de 1994, o uso de STZ ICV como modelo para demência esporádica do tipo Alzheimer (DETA) começou a ser utilizado. A principal alteração bioquímica proposta pelo modelo é no metabolismo cerebral de glicose, resultante da falta de transdução de sinal do receptor cerebral de insulina, o que gera uma drástica diminuição do uso de glicose cerebral, com diminuição nos níveis de ATP celular. Além disso, produz vários distúrbios metabólicos e comportamentais no cérebro, levando esse modelo a ser conhecido também com um estado cerebral resistente à insulina ^{63,65}.

Estudos com a utilização desse modelo também evidenciaram que a injeção ICV de STZ e as alterações cognitivas e comportamentais seguem um padrão temporal, ou seja, dentro do primeiro mês após a injeção, os animais desenvolvem uma resposta aguda. Já de 1 a 3 meses, observa-se uma tendência de melhora nos parâmetros alterados e, por fim, de 6 a 9 meses após a injeção de STZ, há uma descompensação importante, com o agravamento progressivo da doença. Situação semelhante ocorre na história natural da DA, o que diferencia e traz vantagens para esse modelo em relação a um modelo de animais transgênicos ^{63,66}.

Além disso, com o passar do tempo, são observados no cérebro dos animais submetidos ao modelo alterações importantes em diferentes áreas, em locais relativamente distantes dos ventrículos, como hipocampo e córtex cerebral, alterações, como o surgimento das placas β A, presença de proteína tau hiperfosforilada, estresse oxidativo, danos mitocondriais, alterações que levam a morte celular por apoptose ⁶³.

Deng e colaboradores (2009) sugeriram que o mecanismo chave para o desenvolvimento da DA humana com o uso de STZ é o desenvolvimento da

resistência cerebral à insulina que leva a degeneração neurofibrilar por meio de duas vias interligadas: uma delas diminuindo a sinalização de PI3K/AKT e outra por superativação da glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK3 β) com diminuição da expressão de GLUT1/3, que resultaria em todas as alterações relacionadas à doença, como ilustrado na figura 13 ⁶⁷.

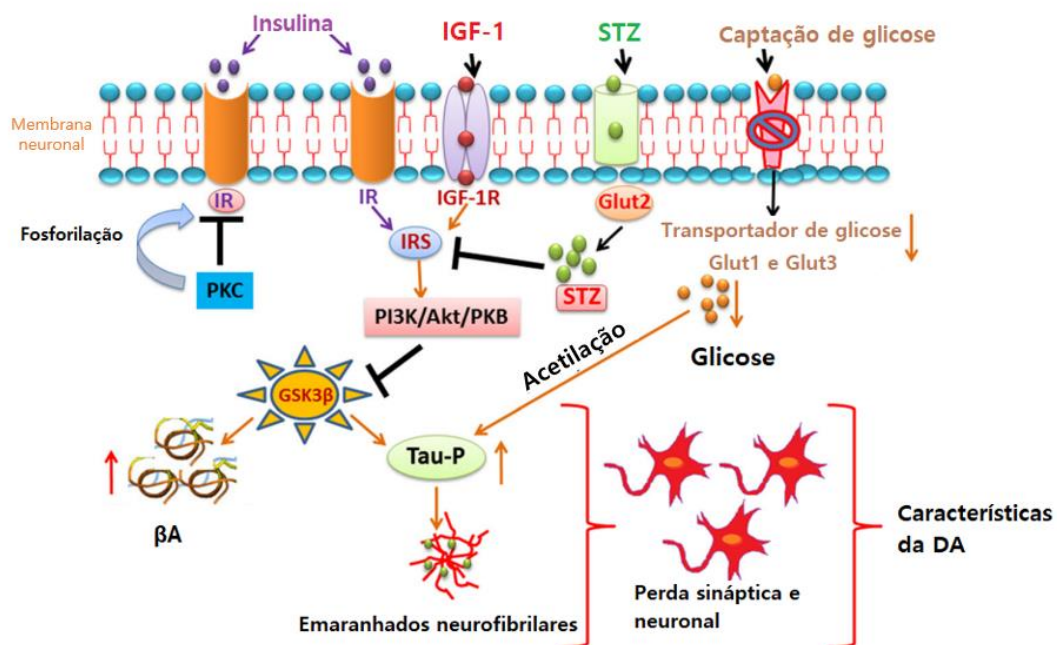


Figura 13. Vias relacionadas à resistência cerebral de insulina com o uso de STZ. Legenda: Akt/PKB: proteína quinase; β A: Peptídeo beta amiloide; Glut 1, 2, 3: Transportador de glicose 1, 2, 3; IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina 1; IGF-1R: Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1; IR: receptor de insulina; GSK3 β : glicogênio sintase quinase 3 beta; PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase; PKC: proteína quinase fosforilada; STZ: Estreptozotocina; Tau-P: proteína Tau fosforilada (Adaptado de Kamat *et al.*, 2016) ⁶⁸.

1.7 ANTICORPOS DE DETECÇÃO POR IMUNORREATIVIDADE

Uma forma de analisar moléculas em diferentes tecidos de maneira sensível e específica é com o uso das técnicas de imuno-peroxidase e imunofluorescência. Tais técnicas baseiam-se na detecção de antígenos, que, neste caso, pode ser qualquer molécula de interesse, com utilização de um anticorpo específico, por meio de reações

químicas. Esses métodos permitem também correlacionar a presença de um antígeno com a sua localização no tecido ou na célula, tornando-se uma ferramenta importante para estudo de lesões e danos celulares nos tecidos normais e patológicos ^{69,70}. Na técnica de imuno-peroxidase, o complexo antígeno-anticorpo será evidenciado com a adição de um agente cromógeno, já na técnica de imunofluorescência o mesmo complexo será visualizado com a adição de fluoróforos ⁷⁰.

Assim, por meio das técnicas descritas, é possível observar características celulares e teciduais presentes em processos inflamatórios e doenças neurodegenerativas, como na DA. Pode-se destacar alguns marcadores importantes nesse contexto: nos astrócitos, a presença das proteínas GFAP, proteína β de ligação de cálcio (S100 β), o fator de transcrição 9 (SOX9); na micróglia, a proteína adaptadora de ligação ao cálcio (Ca^{+2}) ionizado 1 (Iba-1), a presença de neurônios por meio da proteína nuclear neuronal (NeuN) e a presença dos RI também pode ser observada, entre outros marcadores ⁷⁰.

1.7.1 Marcadores celulares associados aos astrócitos

1.7.1.1 GFAP

A GFAP é uma das principais subunidades proteicas que compõem o citoesqueleto das células gliais, principalmente dos astrócitos, fazendo parte dos filamentos intermediários (FI) junto com a vimentina, nestina e sinemina. Possui peso molecular equivalente a 47kDa, com uma cabeça amino terminal, uma porção central em que há uma sequência de aminoácidos extensa em forma de α -hélice, geralmente conservada, e, por fim, uma cauda carboxi terminal. Como faz parte do

citoesqueleto, encontra-se GFAP no citoplasma, sendo um dos marcadores de astrócitos mais conhecidos, observada inicialmente no cérebro de pacientes com esclerose múltipla ^{41,71,72}.

Entre as principais funções, a GFAP está associada com a manutenção da forma e sustentação mecânica dos astrócitos, sendo considerada essencial no processo de astrogliose reativa e formação de cicatriz glial. A astrocitose reativa é marcada por alterações moleculares, celulares e funcionais nos astrócitos em resposta a qualquer forma de agressão ao tecido nervoso. Nesse caso, ocorre o aumento da produção de GFAP relacionada com o aumento de tamanho e hipertrofia dos astrócitos (Figura 14) ^{41,73}.

Outras funções também podem ser atribuídas a GFAP, como os efeitos sobre a proliferação celular, plasticidade sináptica, regulação de neurotransmissores, comunicação entre astrócito e neurônio, auxílio a manter a integridade da BHE e da bainha de mielina ^{71,72}.

Já foram identificadas isoformas da proteína: GFAP α , GFAP γ , GFAP δ/ϵ , GFAP κ , GFAP $\Delta 164$, GFAP $\Delta 135$, GFAP Δ exon6, GFAP+1, que podem ser expressas de forma heterogênea no SNC adulto saudável ou patológico. Geralmente, elas diferem umas das outras na porção terminal, o que faz com que as isoformas tenham funções diferentes. Consequentemente, a alteração na razão das isoformas, no interior da célula, modifica a função dos astrócitos e possivelmente afeta os neurônios próximos ⁷².

A astrogliose reativa com excessiva produção de GFAP é marcadamente observada em doenças neurodegenerativas, como a DA, e está associada ao aumento da produção de radicais livres, alteração na transmissão sináptica e na plasticidade neuronal ^{71,72}.

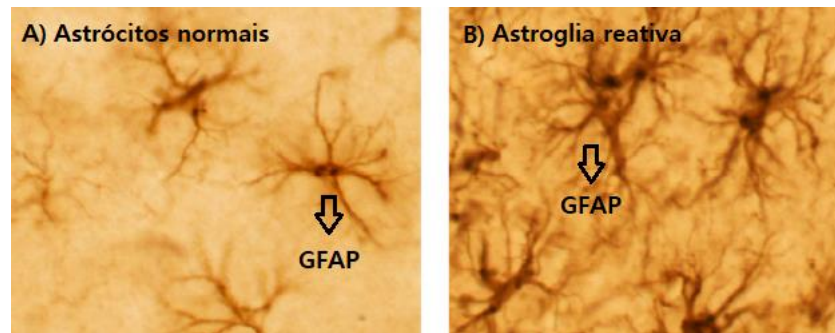


Figura 14. Astrócitos e sua expressão de GFAP. Imuno-peroxidase para observação do GFAP: A) Expressão de GFAP na astroglia normal e na imagem B) expressão de GFAP aumentada associada à astroglia reativa (Adaptado de Sofroniew, 2009) ⁷³.

1.7.1.2 S100 β

A proteína S100 β pertence à família das proteínas sinalizadoras de ligação ao Ca^{+2} . É chamada S100 devido a sua completa solubilidade em sulfato de amônio saturado em pH (potencial hidrogeniônico) neutro. Essa família existe exclusivamente em vertebrados, com cerca de 24 membros observados em humanos. A S100 β pode ser expressa principalmente em astrócitos, células de Schwann, melanócitos, condrócitos e adipócitos, entre outras células ⁷⁴⁻⁷⁶.

É encontrada no citoplasma das células, onde está na sua forma solúvel, também presente ligada à membrana plasmática ou a outras membranas celulares, aos centrômeros, aos microtúbulos e aos FI do citoesqueleto ⁷⁴.

As funções da proteína S100 β podem ser de atuação intracelular. Nesse caso, estão relacionadas com a transmissão de sinais de receptores da superfície celular para moléculas alvo no interior da célula. Dessa forma, promove a proliferação e migração celular, inibindo apoptose e diferenciação, auxilia na manutenção da forma da célula, na transcrição, na degradação proteica, na

homeostase do Ca^{+2} , no metabolismo energético e nas funções enzimáticas por interagir com muitas proteínas ⁷⁷.

A ação também pode ser extracelular, uma vez liberada por células danificadas, a S100 β exerce efeitos regulatórios, ligando-se a receptores, como os receptores para a extremidade de glicação avançada (RAGE), levando a efeitos que podem ser benéficos ou não, atuando em um grande número de células ⁷⁴.

Acredita-se que, no tecido nervoso, em pequenas concentrações, ela é capaz de estimular o crescimento e a sobrevivência durante o desenvolvimento neuronal, porém, em concentrações mais altas, ela tem efeitos prejudiciais ao tecido, aumentando a expressão de citocinas pró-inflamatórias e induzindo a morte neuronal ^{74,76}.

Nos astrócitos, a S100 β atua de forma autócrina. Em doses baixas, estimula a proliferação celular e, em doses mais altas, ativa a síntese de óxido nítrico induzível (iNOS), ativando uma via por meio do fator nuclear kappa B (NF- κ B), gerando apoptose astrocitária. Além disso, esses altos níveis de S100 β regulam positivamente a expressão de interleucina 1 β (IL-1 β), estimulando a liberação de interleucina 6 (IL-6) e TNF- α e ativando os astrócitos (Figura 15). Com isso, altos níveis de S100 β contribuem para a neuroinflamação ⁷⁴.

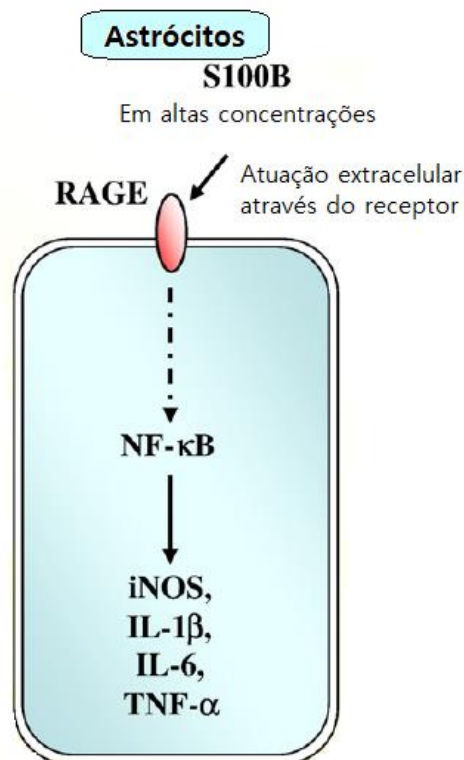


Figura 15. Ação do S100B via receptor RAGE nos astrócitos.

Legenda: IL-1β e IL-6: Interleucina 1β e 6; iNOS: síntese de óxido nítrico induzível; NF-κB: fator nuclear kappa B; RAGE: receptor para a extremidade de glicação avançada; TNF-α: fator de necrose tumoral (Adaptado de Donato *et al.* 2019) ⁷⁴.

A S100β é utilizada, então, como marcador de dano e/ou reação astrocítica em patologias neurodegenerativas, por meio de técnicas como imuno-peroxidase ou imunofluorescência ou, ainda, por dosagens bioquímicas no líquido cefalorraquiano (LCR) e no sangue. Chaves e colaboradores (2010), em um estudo no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em pacientes com DA, mostraram uma relação positiva entre a gravidade da doença e os níveis séricos de S100β ^{76,78}.

1.7.1.3 SOX9

O SOX9 é uma proteína de transcrição, ou seja, trata-se de proteína específica presente nas células eucarióticas, e tem como principal função promover a ligação entre a enzima RNA-polimerase e a molécula de DNA, permitindo a sua

transcrição e, conseqüentemente, sua tradução. Pertence à família SOX de proteínas nos mamíferos, que compreende muitos membros (SOX1 a 15, SOX17, SOX18, SOX21 e SOX30), que são divididos em oito grupos de A a H, como observado na Tabela 1. Dentro do mesmo grupo, as proteínas SOX apresentam um alto nível de homologia, mais de 90%, ou seja, carregam um domínio de 79 aminoácidos que permite a ligação a uma mesma sequência consenso de nucleotídeos, promovendo uma angulação na estrutura da dupla-hélice de DNA, facilitando a aproximação de elementos potencializadores de transcrição ^{79–81}.

Tabela 1. Classificação das proteínas SOX

GRUPO	GENE/PROTEÍNA
SOXA	SRY
SOXB	SOXB1: SOX1, SOX2, SOX3 SOXB2: SOX14 e SOX21
SOXC	SOX4, SOX11, SOX12
SOXD	SOX5, SOX6, SOX13
SOXE	SOX8, SOX9, SOX10
SOXF	SOX7, SOX17, SOX18
SOXG	SOX15
SOXH	SOX30

Legenda: SRY – Região Y determinante do sexo (Adaptado de Stevanovic *et al.*, 2021) ⁸¹.

A função dessas proteínas é regular a especificação e diferenciação de vários tipos celulares, portanto são proteínas nucleares. A SOX9 parece estar envolvida na

formação de células especializadas do sistema esquelético, pâncreas, intestino, rim, testículos, válvulas cardíacas e células do SNC ⁷⁹.

No SNC, a expressão gênica dos membros da família de proteínas SOX está envolvida no desenvolvimento das linhagens celulares, incluindo neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, ou seja, as proteínas SOX expressas atuam em locais específicos do DNA e coordenam a expressão de genes para tornar as células especializadas. A partir de uma célula progenitora neural, os genes membros dos grupos SOXB e SOXC atuam em sequência. Se o destino desta célula é se transformar em neurônio, os genes SOXB1 atuam primeiramente, aumentando sua expressão, porém, se a célula irá se diferenciar e se tornar célula glial, ocorre a ação de SOXC. As proteínas de SOXB1 são essenciais para a formação do neuroectoderma e da placa neural ^{81,82}.

A SOX21 promove o processo de diferenciação neuronal, neutralizando a ação de SOXB1, ou seja, SOX21 permite a progressão da célula para uma nova fase dentro do processo de neurogênese, enquanto SOXB1 faz a manutenção da célula progenitora. Para a célula se tornar um neurônio imaturo, há um aumento na expressão das proteínas do grupo SOXC e SOXD e, para terminar o processo de diferenciação neuronal e o neurônio se tornar maduro, há uma diminuição na expressão de SOX11 (Figura 16) ⁸¹⁻⁸³.

Por outro lado, quando uma célula progenitora irá se transformar em uma célula glial, ocorre, primeiramente, a ação de SOX9, promovendo a transformação celular para uma célula progenitora glial. Se for mantida a ação das proteínas SOX9, a célula glial se tornará um astrócito. Já se a ação de SOX9 der lugar à ação de SOX10, a célula se transformará em um oligodentócito (Figura 16) ⁸¹.

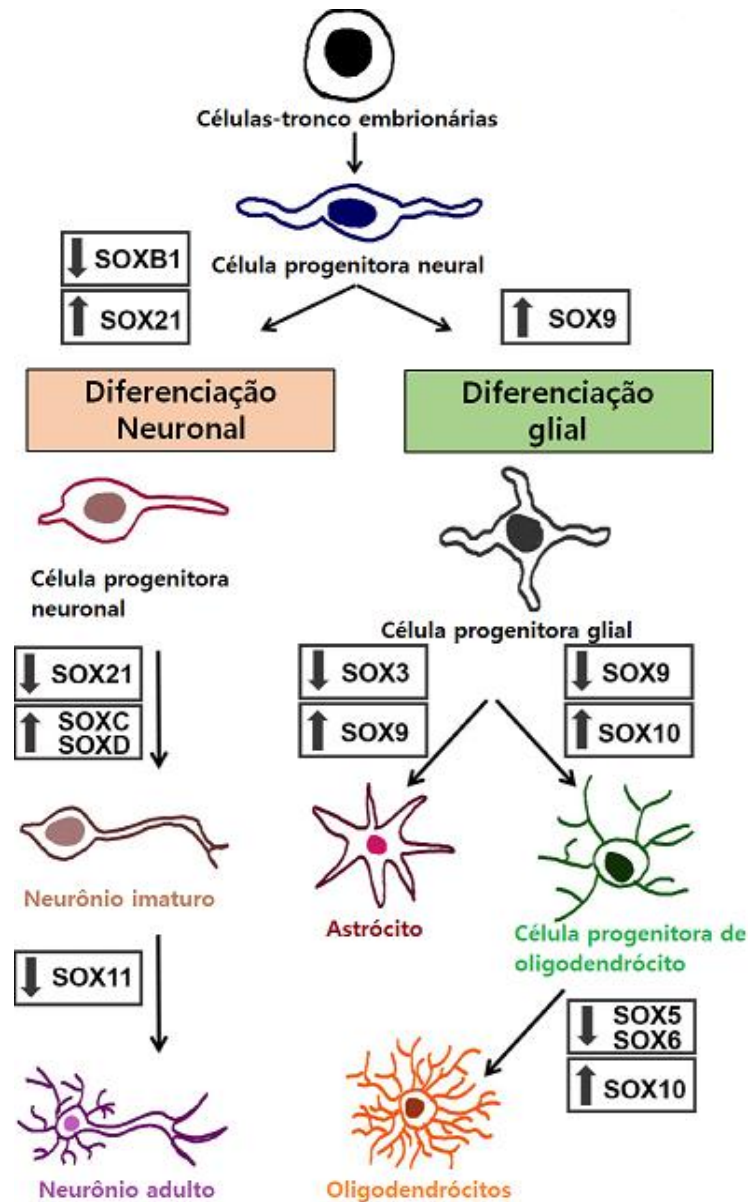


Figura 16. Ação das proteínas da família SOX no desenvolvimento de células do tecido nervoso.

(Adaptado de Stevanovic *et al.*, 2021) ⁸¹.

Assim, estudos sugerem que, no cérebro adulto, a SOX9 é expressa quase que exclusivamente por astrócitos, sendo um marcador específico para sinalizar a ocorrência dessas células fora das regiões de neurogênese. Anticorpos produzidos para a identificação dessa proteína têm apresentado vantagens em relação a outros marcadores de astrócitos, pois sua expressão não é diminuída pela idade, são regulados

positivamente no tecido com cicatriz glial, facilitando, com isso, a quantificação do número relativo de astrócitos no tecido com o uso de técnicas de imunomarcação ⁸⁴.

1.7.2 Iba-1 como marcador associado a micrógliia

A Iba-1 é codificada pelo gene do fator inflamatório 1 do aloenxerto (Aif1). É considerada uma proteína pequena, com 17kDa, composta por 147 aminoácidos, possui dois *EF hands* (“mãos EF”), característica estrutural de algumas proteínas de ligação ao Ca^{+2} , e que sua estrutura alterna hélice-alça-hélice, tornando-se semelhante aos dedos da mão humana. A alça gerada por essa estrutura é o local em que os íons de Ca^{+2} são ligados (Figura 17). Essas porções presentes em Iba-1 mostram homologia com outras proteínas adaptadoras de Ca^{+2} , porém suas regiões amino e carboxi terminal não têm homologia com qualquer outra proteína conhecida ^{85,86}.

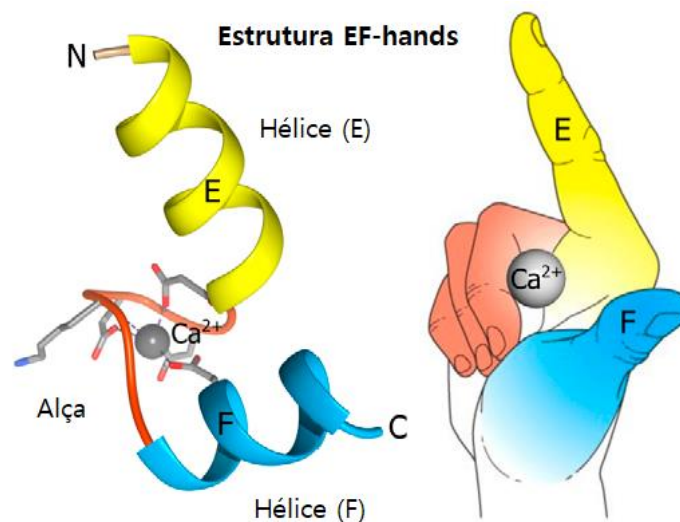


Figura 17. Estrutura EF-hands de proteínas ligadoras de Cálcio.

Legenda: C: extremidade carboxi terminal da proteína; Ca^{+2} : cálcio E: hélice proteica; F: hélice proteica; N: extremidade N-terminal da proteína (Adaptado de Kazakov et al., 2016) ⁸⁷.

Uma cópia genômica do gene Iba-1 foi mapeada dentro do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe III, sendo que a proteína foi expressa em linhagens de células monocíticas, e o ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de Iba-1 foi especificamente isolado em micróglia de células cerebrais cultivadas. Assim, sugere-se que Iba-1 funciona como a molécula adaptadora de Ca^{+2} na linhagem monocítica incluindo a micróglia ⁸⁵.

Com isso, Iba-1 é uma proteína citoplasmática expressa exclusivamente por macrófagos e micróglia. É um ótimo marcador para essas células, interage com os filamentos de actina, auxilia na migração celular e está associada às atividades pró-inflamatórias ⁸⁸.

Lituma e colaboradores (2021) realizaram um experimento com camundongos utilizando uma abordagem de perda genética. Observaram que animais sem a produção de Iba-1 apresentaram alterações microgliais na estrutura e função, além de déficits nas sinapses excitatórias e mudanças no comportamento. Mostrando que a proteína tem uma função importante no neurodesenvolvimento até o refinamento sináptico, fornecendo contribuições importantes para entender a interação micróglia – sinapse ⁸⁸.

1.7.3 NeuN como marcador nuclear de neurônios maduros

A NeuN foi descoberta em 1992, está presente somente no tecido nervoso, visto que não foi encontrada nas células gliais, portanto ela é uma proteína específica de neurônios. Ela surge durante a embriogênese, nos neuroblastos pós-mitóticos, e permanece nos neurônios em diferenciação e já diferenciados ao longo

da vida neuronal. É uma proteína predominante no núcleo da célula e com uma pequena quantidade no citoplasma perinuclear ^{89,90}.

Foram observadas duas isoformas de NeuN: uma de 46kDa e outra de 48kDa. Acredita-se que elas diferem em uma curta sequência de aminoácidos e na relação de sua concentração no núcleo e citoplasma, sendo que a isoforma 48kDa sempre predomina no citoplasma. Dentro do núcleo, a proteína se localiza em locais com baixa densidade de cromatina e está ausente em áreas com empacotamento denso de DNA ^{89,90}.

Existem evidências de que a proteína NeuN é um produto do gene Fox-3, um membro da família de genes Fox, que produzem proteínas reguladoras de *splicing*, processo em que ocorre a remoção dos íntrons, com posterior organização dos éxons para gerar novas proteínas, ou seja, essas proteínas fazem a orientação dos éxons, gerando um mRNA. Com isso, uma das funções descritas de NeuN é como proteína reguladora de *splicing* nos neurônios ⁹¹.

O *splicing* é um mecanismo interessante para a regulação pós-transcricional da expressão gênica, pois é uma importante fonte para a diversidade genômica. No caso do *splicing* neuronal, pode influenciar diretamente na neurogênese, formação de sinapses, nas atividades neurológicas, sendo fundamental para o desenvolvimento e funções do sistema nervoso ⁹².

A NeuN é um marcador sensível e específico, principalmente em tecidos fixados com formol e embebidos em parafina. Após uma recuperação antigênica, os núcleos neuronais e o citoplasma próximo à região do núcleo ficam muito bem corados. Os axônios e dendritos não expressam esse marcador, e a expressão também é mais rara em neuroblastos antes da sua migração ⁹².

Algumas alterações no SNC mudam a expressão de NeuN, como nas doenças neurodegenerativas, em que se observa uma diminuição na marcação por imuno-histoquímica dessa proteína, pois, nesse caso, o tecido nervoso pode estar sofrendo com a perda de diferenciação neuronal ou aumento da morte celular por apoptose⁹⁰.

1.8 TAURINA

A taurina (ácido 2-aminoetanossulfônico) ($C_2H_7NO_3S$) é um aminoácido especial que contém em sua estrutura um grupo sulfonato e não possui o grupo carboxila (Figura 18). Recebeu esse nome porque foi isolada pela primeira vez em 1827, a partir da bile do boi, ou seja, da espécie *taurus*. Está amplamente distribuída em vários tecidos corporais, com destaque para o cérebro, medula espinhal, coração, células musculares, leucócitos e retina. É considerada um osmólito orgânico, isto é, uma molécula que faz um contrabalanço com o ambiente, ao estresse osmótico, envolvida na regulação do volume celular. Fornece substrato para os sais biliares e tem papel na regulação da concentração intracelular de Ca^{+2} ^{93,94}.

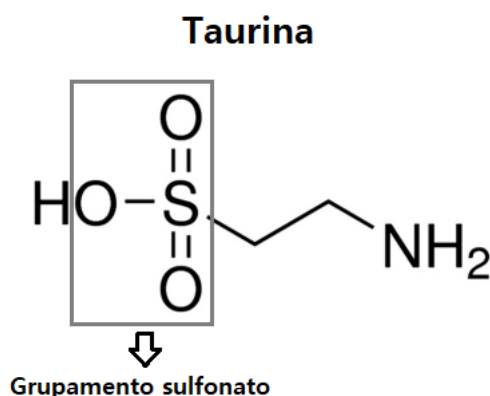


Figura 18. Estrutura química da taurina.
(Adaptado de Chen *et al.*, 2019)⁹⁴.

A taurina pode ser ingerida na alimentação, e está presente em diversos alimentos, como carne bovina, de frango, ostra, camarão, atum, fígado, leguminosas e oleaginosas. Nesse caso, será absorvida no intestino, mas também é sintetizada no organismo por diferentes vias. Uma via importante de formação da taurina é a partir da cisteína, que sofre três reações enzimáticas sequenciais: começando com ação de cisteína dioxigenase, que forma o ácido cisteína sulfínico, seguida pela ação da sulfinoalanina descarboxilase, gerando a hipotaurina, e, por fim, age a enzima hipotaurina desidrogenase, formando a taurina (Figura 19) ^{93,94}. Outra maneira de formar a substância é por meio da via de transulfuração, que irá converter a homocisteína, que pode ser proveniente do aminoácido metionina, em cistationina pela ação da enzima cistationina β-sintase, então a cistationina é convertida em cisteína e pode entrar na via anteriormente comentada. A taurina pode também ser formada a partir da coenzima A, que é degradada em cisteamina, que consegue ser oxidada em hipotaurina, que entra na primeira via ^{94,95}.

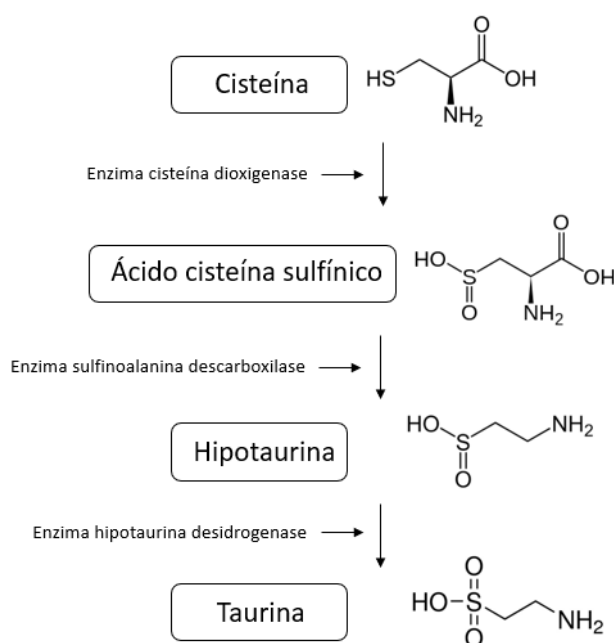


Figura 19. Principal via de formação da taurina. (Adaptado de Ripps e Shen, 2012) ⁹³.

A taurina não é um aminoácido incorporado nas proteínas, sua ação se dá em várias células de diferentes tecidos. Para isso, a taurina precisa ser transportada através da membrana plasmática para o interior das células, pois possui uma baixa capacidade de difusão passiva. Para os diversos locais do corpo, existem transportadores típicos de taurina (TauT), como a família de transportadores de solutos 6 membrana 6 (SLC6A6) que está distribuída em células do músculo esquelético, tireoide, coração, pulmão, cérebro, fígado, rim, intestino e osteoblastos. Outro transportador conhecido de taurina é o transportador próton-depende 1 (PAT1), que é capaz de transportar outros substratos, como glicina, ácido gama-aminobutírico (GABA) e prolina, sendo encontrado em diferentes órgãos, como intestino, coração, músculo, fígado, rim, pulmão, cérebro, estômago, baço e testículo. Os TauT usam um sistema de transporte dependente dos íons sódio (Na^+) e cloro (Cl^-) de alta afinidade ^{94,96}.

A taurina é produzida principalmente no fígado e, devido a sua estrutura química, presença do grupo sulfonato, dificulta sua passagem pela BHE, já que tem baixa solubilidade em água. Portanto, sabe-se que na membrana celular da BHE tem o transportador GABA e um transportador de solutos 6 membrana 13 (SLC6A13), também conhecido como GAT-2, que é um TauT capaz de auxiliar no transporte da taurina e da hipotaurina para o sistema nervoso ^{97,98}.

Para melhorar essa passagem, pesquisas mostram que fármacos lipossolúveis com taurina na sua composição, ou outros derivados de taurina que atravessam a BHE, têm a capacidade de se transformar em taurina no sistema nervoso, aumentando assim a disponibilidade da taurina e sua ação nesse local ⁹⁹.

No sistema nervoso, observa-se a presença de TauT em maior quantidade nos astrócitos e em menor quantidade nos neurônios, sendo este transportador

fundamental para a captação da taurina dentro do parênquima cerebral. Já a liberação de taurina acontece através de canais de ânion regulados por volume (VRACs) ativados por edema celular⁹⁸.

1.8.1 Taurina e suas funções biológicas

As funções biológicas da taurina são inúmeras. Uma delas é a modulação da homeostase de íons de Ca^{+2} . Nesse contexto, a taurina é capaz de estabilizar a quantidade de Ca^{+2} dentro da célula, lembrando que o excesso deste íon pode levar à morte celular. Assim, a taurina protege contra o influxo de Ca^{+2} induzido pelo glutamato, que, por sua vez, aumenta o nível de Ca^{+2} intracelular e provoca um colapso nas membranas mitocondriais, o que leva a um esgotamento da produção de energia. A taurina também regula indiretamente a ação da cálcio ATPase reticular, que é responsável pela eliminação de Ca^{+2} do citosol ^{99–101}.

A osmoregulação é outra função importante desse aminoácido. Em ambientes hipertônicos, as células acumulam taurina, pois, devido às características químicas, ela consegue entrar na célula sem provocar alterações no volume celular. Já em ambientes hipotônicos, a célula libera taurina. Além disso, a taurina influencia no equilíbrio dos íons de Ca^{+2} , Na^{+} e potássio (K^{+}) ^{99,100}.

A taurina provoca proteção contra estresse oxidativo nas mitocôndrias, por diferentes mecanismos. Um deles seria por meio de um eliminador direto de ácido hipocloroso (HOCl), que será gerado a partir de H_2O_2 , na presença de íons de cloreto, produzindo a N-clorotaurina. Esse composto, por sua vez, tem um papel na regulação da resposta inflamatória. Outra maneira de a taurina exercer sua função antioxidante é promovendo aumento da glutatona reduzida intracelular (GSH), molécula essencial

para desintoxicação celular. Também já foi observada a presença de taurina conjugada a uridinas, formadoras do ácido ribonucleico transportador (tRNA) de mitocôndrias, promovendo traduções de proteínas, sem ser incorporado nelas, o que também pode estar associado à função antioxidante ^{94,100,102}.

Outra função bastante conhecida da taurina é a conjugação de sais biliares no fígado, fazendo com que a bile seja excretada adequadamente. O estudo de Johnson e colaboradores (1991) purificou a enzima conjugadora de ácidos biliares e conseguiu mostrar que tal enzima utiliza taurina como substrato ¹⁰³.

A taurina também é conhecida por reduzir os sintomas associados ao estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus II, bem como melhorar complicações, como nefropatia, retinopatia e neuropatia relacionadas com essa doença. Quando se suplementa a taurina em pacientes com diabetes, os níveis de glicose são restaurados, a secreção de insulina é aumentada e o metabolismo da glicose e de lipídeos nas mitocôndrias são estimulados ^{100,104}.

No sistema cardiovascular, a taurina pode melhorar a insuficiência cardíaca congestiva, aumentando a força de contração do músculo cardíaco, além de atenuar a aterosclerose e doenças coronárias, reduzindo o nível da apolipoproteína B100 (APO B100) ou melhorando a eficácia das contrações ¹⁰⁵. Uma meta-análise realizada por Waldron e colaboradores (2018) mostrou que a suplementação oral com taurina tem efeito anti-hipertensivo, ou seja, ela foi capaz de reduzir a pressão arterial, sem causar efeitos colaterais, tendo uma magnitude clinicamente relevante nesse contexto ¹⁰⁶.

No músculo esquelético, por sua vez, a taurina mostra-se eficiente em promover a excitação para a contração dependente de Ca^{+2} , mantém a defesa antioxidante, melhora a diferenciação e crescimento das fibras musculares, sendo

de extrema necessidade para esse tecido ¹⁰⁷. No sistema renal, a taurina é importante na manutenção osmótica normal, afetando o ciclo e a apoptose celular, sendo protetora contra glomerulonefrites induzidas por toxicidade ou imunológica e em outras patologias renais ¹⁰⁸.

A taurina está presente em altas concentrações na retina, e a deficiência da substância nesse local ocasiona algumas doenças. Atua na proteção de células fotorreceptoras, faz a regulação do transporte de Ca^{+2} e inibição da fosforilação de proteínas, o que é fundamental para manter o desenvolvimento normal da retina ¹⁰⁹.

No sistema nervoso, a taurina está em grande concentração em todas as regiões do cérebro na fase de desenvolvimento. Nos adultos, foram observados altos níveis de taurina, principalmente no bulbo olfatório. É considerada um fator trófico para o desenvolvimento do cérebro, promove proliferação celular e protege de danos induzidos por substâncias tóxicas. Atua como osmorreguladora, regulando principalmente o volume celular, hiperpolariza os neurônios aumentando o influxo de íons cloreto e previne a disfunção mitocondrial. Assim, é importante contra a neuroinflamação e o estresse oxidativo (Figura 20), além de participar de funções associadas à cognição ^{110,111}.

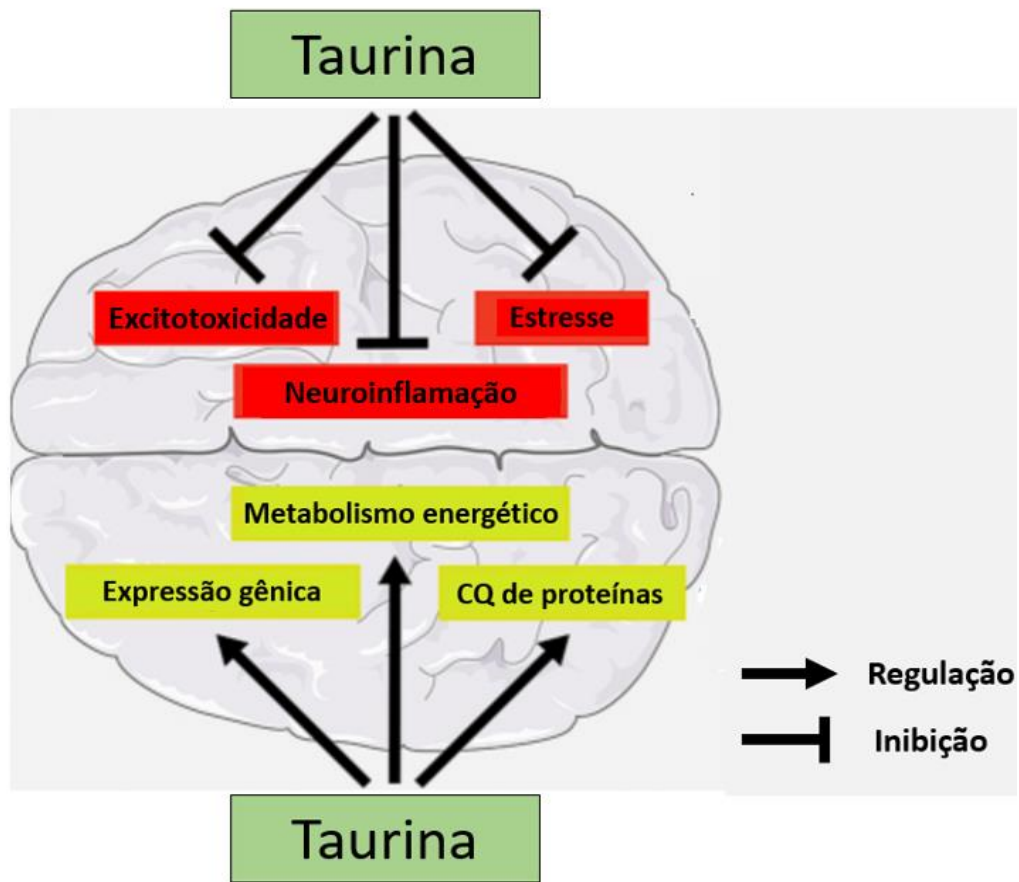


Figura 20. Ação da taurina no SNC.

Legenda: CQ: Controle de Qualidade (Adaptado de Jong, Sandal e Schaffer, 2021)
100.

A taurina mostrou atividade neuroinflamatória em diversos estudos por mecanismos distintos: induzindo a diminuição de muitas interleucinas e elevando somente o nível da proteína 1 alfa inflamatória em macrófagos. Também pode elevar a produção de citocinas pró-inflamatórias nos astrócitos, pode melhorar a ativação microglial causada por agentes intoxicantes e mostra proteção dopaminérgica via inativação dependente de micróglia ^{99,112,113}.

Um estudo realizado por Warton e colaboradores (2004) mostrou níveis plasmáticos de taurina mais baixos associados a baixas pontuações no índice de desenvolvimento mental de Bayley para dezoito meses de vida, mostrando a relação da taurina com alterações cognitivas ¹¹⁴.

Em modelos animais, a taurina também se mostra eficiente em melhorar atividades associadas à cognição. Sajid e colaboradores (2017) constataram que a injeção intraperitoneal de 0,1g por kg por uma semana em ratos *Wistar*, melhora a força muscular e o desempenho dos animais na tarefa do labirinto aquático de Morris, que avalia a memória ¹¹⁵. Nesse sentido, Rahmeier e colaboradores (2016) utilizaram ratos *Wistar* saudáveis e diabéticos, administrando taurina (100mg por Kg) por gavagem, e observaram que os animais tratados melhoraram sua memória e atividade exploratória. Além disso, a taurina interferiu diminuindo a apoptose neuronal, glial e a neurodegeneração ¹¹⁶. A taurina também tem ação importante no cerebelo de animais, local em que parece proteger contra os efeitos inflamatórios provocados por lipopolissacarídeo (LPS) e também tem atividade antiapoptótica nesta região do encéfalo ¹¹⁷.

Com relação à DA, a taurina já foi associada a essa doença, mostrando resultados controversos. Alguns estudos descreveram que o conteúdo endógeno de taurina no LCR de pacientes com DA no estágio final foi significativamente reduzido, sugerindo uma mudança de equilíbrio no ambiente neuronal. Porém outro estudo com pacientes no estágio inicial da doença relatou altos níveis plasmáticos de taurina. Assim, a taurina poderia estar desenvolvendo um papel protetor no início da doença, e os níveis endógenos do aminoácido poderiam predizer clinicamente estágios diferentes da doença, o que também reflete na cognição do paciente ^{118,119}.

A administração de taurina associada à vitamina D3 também já foi utilizada como terapia complementar em pacientes com DA e se mostrou eficaz para melhorar a memória e funções cognitivas ¹²⁰. Muitos modelos animais para DA também são utilizados para avaliar a ação da taurina nos fenômenos cognitivos e

memória, como o modelo animal da demência esporádica do tipo Alzheimer (DETA), induzido por STZ ⁹⁴.

Nesse contexto, Javed e colaboradores (2013) observaram que, em um modelo de DETA induzida por STZ, a taurina foi capaz de proteger contra o estresse oxidativo, melhorando os níveis de GSH, diminuindo o nível elevado de substâncias reativas provenientes do ácido tiobarbitúrico. Além de impedir o esgotamento de enzimas antioxidantes, como glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase, catalase e superóxido dismutase e a alteração morfológica dos neurônios piramidais do hipocampo. A taurina também conseguiu restaurar as atividades das enzimas acetilcolinesterase e da colina acetiltransferase, que são importantes na regulação da acetilcolina ¹²¹.

Em outros modelos experimentais para DA, a taurina também foi capaz de melhorar as alterações cognitivas, como em camundongos por ligação direta com os β A e também em uma linhagem de ratos adultos (APP/PS1) ¹²².

Além de ter benefícios contra a DA, a taurina mostrou efeitos positivos no sistema nervoso na doença de Parkinson, também com mecanismos que levam à diminuição do estresse oxidativo. Na doença de Huntington, mostrou efeito neuroprotetor, melhorando as disfunções comportamentais, e efeito antioxidante. Já em modelo de esclerose lateral amiotrófica, a taurina protegeu neurônios motores cultivados de lesão neurotóxica induzida por glutamato e também protegeu contra a perda de neurônios motores em camundongos transgênicos ⁹⁹.

Na neuropatia diabética, a taurina também tem um papel farmacológico conhecido, tendo ações contra o estresse oxidativo induzido por altas concentrações glicose, o que pode ser observado em alguns modelos com o uso de STZ,

mostrando que ativa vias antioxidantes, além de aumentar a expressão de transportadores de glicose 1 e 3 ¹²³.

Considerando a importância da taurina para regular diversos processos biológicos, ainda existe uma lacuna de evidências da atuação desse composto sobre a população de neurônios e células gliais no hipocampo. Há carência também no que se refere à caracterização de seus possíveis benefícios sobre a memória. Nesse contexto, torna-se relevante avaliar seu efeito em um modelo que mimetize a DA esporádica, como o modelo DETA induzido por STZ.

Sabendo-se que a DA provoca intensa inflamação no tecido nervoso, associada com perda de memória com o hipocampo afetado, torna-se relevante o estudo da dinâmica do hipocampo com relação aos aspectos histológicos em um modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer, além de observar o que a taurina pode reverter nesse contexto.

REFERÊNCIAS

1. Amaral, D. G. and Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*. 1989;31(3):571–91.
2. Tatu L, Vuillier F. Structure and vascularization of the human hippocampus. *Hippocampus Clin Neurosci*. 2014;34:18–25.
3. Schultz C, Engelhardt M. Anatomy of the hippocampal formation. *Hippocampus Clin Neurosci*. 2014;34:6–17.
4. Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol*. 2015;25(23):R1116–21.
5. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(6):425–36.
6. Lörincz A, Buzsáki G. Two-phase computational model training long-term memories in the entorhinal-hippocampal region. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;911:83–111.
7. Izquierdo I, Bevilaqua LRM, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci*. 2006;29(9):496–505.
8. Bear M, Connors B, Paradiso M, Jorge Alberto C. *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*. 4th ed. Porto Alegre: Artmed; 2017.
9. Shu SY, Wu YM, Bao XM, Leonard B. Interactions among memory-related centers in the brain. *J Neurosci Res*. 2003;71(5):609–16.
10. Amadio M, Govoni S, Alkon DL, Pascale A. Emerging targets for the pharmacology of learning and memory. *Pharmacol Res*. 2004;50(2):111–22.
11. McGaugh JL. Memory - A century of consolidation. *Science* (80-). 2000;287(5451):248–51.
12. Abel T, Lattal KM. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol*. 2001;11(2):180–7.
13. Squire LR. Memory and the Hippocampus: A Synthesis From Findings With Rats, Monkeys, and Humans. *Psychol Rev*. 1992;99(2):195–231.
14. Tulving E. EPISODIC MEMORY : From Mind to Brain. *Annu Rev Psychol*. 2002;53:1–25.
15. Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER. Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(24):13445–52.

16. Genzel L, Schut E, Schröder T, Eichler R, Khamassi M, Gomez A, et al. The object space task shows cumulative memory expression in both mice and rats. *PLoS Biol.* 2019;17(6):1–25.
17. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *Eur J Pharmacol.* 2003;463(1–3):3–33.
18. Dodart JC, Mathis C, Ungerer A. Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice. *Neuroreport.* 1997;8(5):1173–8.
19. Brodziak A, Kołat E, Różyk-Myrta A. In search of memory tests equivalent for experiments on animals and humans. *Med Sci Monit.* 2014;20:2733–9.
20. Deacon RMJ, Rawlins JNP. T-maze alternation in the rodent. *Nat Protoc.* 2006;1(1):7–12.
21. Pacheco SM, Soares MSP, Gutierrez JM, Gerzson MFB, Carvalho FB, Azambuja JH, et al. Anthocyanins as a potential pharmacological agent to manage memory deficit, oxidative stress and alterations in ion pump activity induced by experimental sporadic dementia of Alzheimer's type. *J Nutr Biochem [Internet].* 2018;56:193–204. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.02.014>
22. Denning T BSM. Dementia: definitions and types. *Nurs Stand.* 2015;29(37):37–42.
23. Gale SA, Acar D, Daffner KR. Dementia. *Am J Med.* 2018;131(10):1161–9.
24. Neto JG, Tamelini MG, Forlenza OV. Diagnóstico diferencial das demências. *Rev Psiq Clín.* 2005;32(3):119–30.
25. O'Brien JT, Thomas A. Vascular dementia. *Lancet [Internet].* 2015;386(10004):1698–706. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00463-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00463-8)
26. Mueller C, Ballard C, Corbett A, Aarsland D. The prognosis of dementia with Lewy bodies. *Lancet Neurol [Internet].* 2017;16(5):390–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30074-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30074-1)
27. Deleon J, Miller BL. Frontotemporal dementia [Internet]. 1st ed. Vol. 148, *Handbook of Clinical Neurology.* Elsevier B.V.; 2018. 409–430 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-64076-5.00027-2>
28. Möller HJ, Graeber MB. The case described by Alois Alzheimer in 1911. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 1998;248(3):111–22.
29. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011;1(1):1–23.

30. Prince M, Albanese E, Guerchet M, Prina M. World Alzheimer Report 2014 Dementia and Risk Reduction An Analysis of pRotective AnD moDifiAble fActoRs EXECUTIVE SUMMARY dr Maëlen Guerchet dr Matthew prina. 2014; Available from: www.daviddesigns.co.uk
31. Machado APR, Carvalho IO, Rocha Sobrinho HM da. Neuroinflamação Na Doença De Alzheimer. *Rev Bras Mil Ciências*. 2020;6(14).
32. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement*. 2020;16(3):391–460.
33. Soria Lopez JA, González HM, Léger GC. Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol*. 2019;167:231–55.
34. Villain N, Dubois B. Alzheimer's Disease Including Focal Presentations. *Semin Neurol*. 2019;39(2):213–26.
35. Mitew S, Kirkcaldie MTK, Dickson TC, Vickers JC. Altered synapses and gliotransmission in alzheimer's disease and AD model mice. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2013;34(10):2341–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.04.010>
36. Querfurth HW, Laferla FM. Alzheimer's Disease. 2018;329–44.
37. Crowther RA. Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(6):2288–92.
38. Li HL, Wang HH, Liu SJ, Deng YQ, Zhang YJ, Tian Q, et al. Phosphorylation of tau antagonizes apoptosis by stabilizing β -catenin, a mechanism involved in Alzheimer's nerodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(9):3591–6.
39. Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VMY. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(10):783–93.
40. Allen NJ. Astrocyte regulation of synaptic behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30(1):439–63.
41. Sofroniew M V., Vinters H V. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):7–35.
42. Jha MK, Jo M, Kim JH, Suk K. Microglia-Astrocyte Crosstalk: An Intimate Molecular Conversation. *Neuroscientist*. 2019;25(3):227–40.
43. Kraft AW, Hu X, Yoon H, Yan P, Xiao Q, Wang Y, et al. Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *FASEB J*. 2013;27(1):187–98.
44. Medeiros R, LaFerla FM. Astrocytes: Conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Exp Neurol* [Internet]. 2013;239(1):133–8.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.10.007>

45. Fan YY, Huo J. A1/A2 astrocytes in central nervous system injuries and diseases: Angels or devils? *Neurochem Int* [Internet]. 2021;148(February):105080. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105080>
46. Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: The role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(6):358–72.
47. Sierra-Filardi E, Puig-Kröger A, Blanco FJ, Nieto C, Bragado R, Palomero MI, et al. Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood*. 2011;117(19):5092–101.
48. Fan Y, Xie L, Chung CY. Signaling pathways controlling microglia chemotaxis. *Mol Cells*. 2017;40(3):163–8.
49. Armstrong DM, Saper CB, Levey AI, Wainer BH, Terry RD. Distribution of cholinergic neurons in rat brain: Demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. *J Comp Neurol*. 1983;216(1):53–68.
50. Rand JB. Acetylcholine. *WormBook*. 2007;1–21.
51. Grothe MJ, Schuster C, Bauer F, Prudlo J, Teipel SJ, Heinsen H. Atrophy of the cholinergic basal forebrain in dementia with lewy bodies and alzheimer's disease dementia. *J Neurol*. 2014;261(1):1939–48.
52. Haam J, Yakel JL. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. *J Neurochem*. 2017;142(2):111–21.
53. Ehret MJ, Chamberlin KW. Current Practices in the Treatment of Alzheimer Disease: Where is the Evidence after the Phase III Trials? *Clin Ther* [Internet]. 2015;37(8):1604–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.05.510>
54. Kellar D, Craft S. Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and related disorders: mechanisms and therapeutic approaches. *Lancet Neurol* [Internet]. 2020;19(9):758–66. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30231-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30231-3)
55. Banks WA. The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol*. 2004;490(1–3):5–12.
56. Grünblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P, Hoyer S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J Neurochem*. 2007;101(3):757–70.
57. Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic

- Alzheimer-like pathology: An experimental approach. *J Neural Transm Suppl.* 2007;(72):217–33.
58. Kullmann S, Heni M, Hallschmid M, Fritsche A, Preissl H, Häring HU. Brain insulin resistance at the crossroads of metabolic and cognitive disorders in humans. *Physiol Rev.* 2016;96(4):1169–209.
 59. Saltiel AR. Insulin signaling in health and disease. *J Clin Invest* [Internet]. 2021;(17):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI142241>.
 60. Nowell J, Blunt E, Edison P. Incretin and insulin signaling as novel therapeutic targets for Alzheimer's and Parkinson's disease. *Mol Psychiatry.* 2023;28(1):217–29.
 61. S, Edzikowska A, Szablewski L, Rostagno AA, Baranowska-Bik A, Orzechowski A. Molecular Sciences Insulin and Insulin Resistance in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021;22:9987. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms>
 62. Degenhardt TP, Alderson NL, Arrington DD, Beattie RJ, Basgen JM, Steffes MW, et al. Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Kidney Int.* 2002;61(3):939–50.
 63. Grieb P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Mol Neurobiol.* 2016;53(3):1741–52.
 64. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001;50(6):537–46.
 65. Duelli R, Schröck H, Kuschinsky W, Hoyer S. Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. *Int J Dev Neurosci.* 1994;12(8):737–43.
 66. Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Hoyer S, Riederer P. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *J Neural Transm.* 2013;120(1):233–52.
 67. Deng Y, Li B, Liu Y, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX. Dysregulation of insulin signaling, glucose transporters, O-GlcNAcylation, and phosphorylation of tau and neurofilaments in the brain: Implication for Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 2009;175(5):2089–98.
 68. Kamat PK, Kalani A, Rai S, Tota SK, Kumar A, Ahmad AS. Streptozotocin Intracerebroventricular-Induced Neurotoxicity and Brain Insulin Resistance: a Therapeutic Intervention for Treatment of Sporadic Alzheimer's Disease (sAD)-Like Pathology. *Mol Neurobiol.* 2016;53(7):4548–62.
 69. Ramos-Vara JA. Principles and methods of immunohistochemistry. *Methods*

- Mol Biol. 2017;1641:115–28.
70. Kyuseok Im, Sergey Mareninov, M. Fernando Palma Diaz WHY. An introduction to Performing Immunofluorescence Staining Kyuseok. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:299–311.
 71. Brenner M. Role of GFAP in CNS injuries. *Neurosci Lett.* 2014;565:7–13.
 72. Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2011;93(3):421–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.005>
 73. Sofroniew M V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* [Internet]. 2010;32(12):638–47. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/69988/FT_69988.html
 74. Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, et al. S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2009;1793(6):1008–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.11.009>
 75. Donato R. S100: A multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33(7):637–68.
 76. Astrand R, Undén J. Clinical use of the calcium-binding S100B protein, a biomarker for head injury. *Methods Mol Biol.* 2019;1929:679–90.
 77. Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, et al. Functions of S100 Proteins. *Curr Mol Med.* 2013;13(1):24–57.
 78. Chaves ML, Camozzato AL, Ferreira ED, Piazenski I, Kochhann R, Dall'Igna O, et al. Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients. *J Neuroinflammation.* 2010;7:1–7.
 79. Kiefer JC. Back to basics: Sox genes. *Dev Dyn.* 2007;236(8):2356–66.
 80. Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol.* 2000;227(2):239–55.
 81. Stevanovic M, Drakulic D, Lazic A, Ninkovic DS, Schwirtlich M, Mojsin M. SOX Transcription Factors as Important Regulators of Neuronal and Glial Differentiation During Nervous System Development and Adult Neurogenesis. *Front Mol Neurosci.* 2021;14(March):1–24.
 82. Bergsland M, Ramsköld D, Zaouter C, Klum S, Sandberg R, Muhr J. Sequentially acting Sox transcription factors in neural lineage development. *Genes Dev.* 2011;25(23):2453–64.

83. Whittington N, Cunningham D, Le TK, De Maria D, Silva EM. Sox21 regulates the progression of neuronal differentiation in a dose-dependent manner. *Dev Biol* [Internet]. 2015;397(2):237–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.11.012>
84. Sun W, Cornwell A, Li J, Peng S, Joana Osorio M, Aalling N, et al. SOX9 is an astrocyte-specific nuclear marker in the adult brain outside the neurogenic regions. *J Neurosci*. 2017;37(17):4493–507.
85. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Mol Brain Res*. 1998;(57):1–9.
86. Lewit-bentley A, Réty S. EF-hand calcium-binding proteins. 2000;637–43.
87. Kazakov AS, Sokolov AS, Vologzhannikova AA, Maria E, Khorn PA, Ismailov RG, et al. Interleukin-11 binds specific EF-hand proteins via their conserved structural motifs Publisher : Taylor & Francis. 2016;1102(January).
88. Lituma PJ, Woo E, Hara BFO, Castillo PE. Altered synaptic connectivity and brain function in mice lacking microglial adapter protein Iba1. 2021;118(46).
89. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. 1992;116(1):201–11.
90. Gusel'nikova V V., Korzhevskiy DE. NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. *Acta Naturae*. 2015;7(2):42–7.
91. Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S. Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J Biol Chem* [Internet]. 2009;284(45):31052–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.052969>
92. Duan W, Zhang YP, Hou Z, Huang C, Zhu H, Zhang CQ, et al. Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator. *Mol Neurobiol*. 2016;53(3):1637–47.
93. Ripps H, Shen W. Review: Taurine: A “very essential” amino acid. *Mol Vis*. 2012;18(November):2673–86.
94. Chen C, Xia SF, He J, Lu G, Xie Z, Han H. Roles of taurine in cognitive function of physiology, pathologies and toxication. *Life Sci* [Internet]. 2019;231(April):116584. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116584>
95. Dominy JE, Simmons CR, Hirschberger LL, Hwang J, Coloso RM, Stipanuk MH. Discovery and characterization of a second mammalian thiol dioxygenase, cysteamine dioxygenase. *J Biol Chem*. 2007;282(35):25189–98.
96. Jhiang SM, Fithian L, Smanik P, McGill J, Tong Q, Mazzaferri EL. Cloning of

- the human taurine transporter and characterization of taurine uptake in thyroid cells¹ 1 The cDNA sequence of HTAU has been deposited in EMBL. FEBS Lett. 1993;318(2):139–44.
97. Tamai I, Senmaru M, Terasaki T, Tsuji A. Na⁺- and Cl⁻-Dependent transport of taurine at the blood-brain barrier. *Biochem Pharmacol.* 1995;50(11):1783–93.
 98. Rafiee Z, García-Serrano AM, Duarte JMN. Taurine Supplementation as a Neuroprotective Strategy upon Brain Dysfunction in Metabolic Syndrome and Diabetes. *Nutrients.* 2022;14(6):1–20.
 99. Jakaria M, Azam S, Haque ME, Jo SH, Uddin MS, Kim IS, et al. Taurine and its analogs in neurological disorders: Focus on therapeutic potential and molecular mechanisms. *Redox Biol [Internet].* 2019;24(February):101223. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101223>
 100. Jong CJ, Sandal P, Schaffer SW. The role of taurine in mitochondria health: More than just an antioxidant. *Molecules.* 2021;26(16):1–21.
 101. Murakami S. Role of taurine in the pathogenesis of obesity. *Mol Nutr Food Res.* 2015;59(7):1353–63.
 102. Suzuki T, Suzuki T, Wada T, Saigo K, Watanabe K. Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: New insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *EMBO J.* 2002;21(23):6581–9.
 103. Johnson MR, Barnes S, Kwakye JB, Diasio RB. Purification and characterization of bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase from human liver. *J Biol Chem.* 1991;266(16):10227–33.
 104. Maleki V, Mahdavi R, Hajizadeh-Sharafabad F, Alizadeh M. The effects of taurine supplementation on oxidative stress indices and inflammation biomarkers in patients with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetol Metab Syndr [Internet].* 2020;12(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13098-020-0518-7>
 105. Yanagita T, Han SY, Hu Y, Nagao K, Kitajima H, Murakami S. Taurine reduces the secretion of apolipoprotein B100 and lipids in HepG2 cells. *Lipids Health Dis.* 2008;7:1–6.
 106. Waldron M, Patterson SD, Tallent J, Jeffries O. The Effects of Oral Taurine on Resting Blood Pressure in Humans: a Meta-Analysis. *Curr Hypertens Rep.* 2018;20(9).
 107. Spriet LL, Whitfield J. Taurine and skeletal muscle function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2015;18(1):96–101.
 108. Chesney RW, Han X, Patters AB. Taurine and the renal system. *J Biomed Sci.* 2010;17(SUPPL. 1):1–10.

109. Lombardini JB. Taurine: retinal function. *Brain Res Rev.* 1991;16(2):151–69.
110. Pasantes-Morales H, Hernández-Benítez R. Taurine and brain development: Trophic or cytoprotective actions? *Neurochem Res.* 2010;35(12):1939–43.
111. Oja SS, Saransaari P. Significance of taurine in the brain. *Adv Exp Med Biol.* 2017;975:89–94.
112. Su Y, Fan W, Ma Z, Wen X, Wang W, Wu Q, et al. Taurine improves functional and histological outcomes and reduces inflammation in traumatic brain injury. *Neuroscience.* 2014;266:56–65.
113. Zhao H, Qu J, Li Q, Cui M, Wang J, Zhang K, et al. Taurine supplementation reduces neuroinflammation and protects against white matter injury after intracerebral hemorrhage in rats. *Amino Acids [Internet].* 2018;50(3–4):439–51. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2529-8>
114. Wharton BA, Morley R, Isaacs EB, Cole TJ, Lucas A. Low plasma taurine and later neurodevelopment. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2004;89(6):497–8.
115. Sajid I, Ahmad S, Emad S, Batool Z, Khaliq S, Anis L, et al. Enhanced physical endurance and improved memory performance following taurine administration in rats. *Pak J Pharm Sci.* 2017;30(5):1957–63.
116. Rahmeier FL, Zavalhia LS, Tortorelli LS, Huf F, Géa LP, Meurer RT, et al. The effect of taurine and enriched environment on behaviour, memory and hippocampus of diabetic rats. *Neurosci Lett [Internet].* 2016;630:84–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.07.032>
117. Silva SP, Zago AM, Carvalho FB, Germann L, Colombo GDM, Rahmeier FL, et al. Neuroprotective Effect of Taurine against Cell Death, Glial Changes, and Neuronal Loss in the Cerebellum of Rats Exposed to Chronic-Recurrent Neuroinflammation Induced by LPS. *J Immunol Res.* 2021;2021.
118. Chouraki V, Preis SR, Yang Q, Beiser A, Li S, Larson MG, et al. Association of amine biomarkers with incident dementia and Alzheimer's disease in the Framingham Study. *Alzheimer's Dement [Internet].* 2017;13(12):1327–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2017.04.009>
119. Fekkes D, Van Der Cammen TJM, Van Loon CPM, Verschoor C, Van Harskamp F, De Koning I, et al. Abnormal amino acid metabolism in patients with early stage Alzheimer dementia. *J Neural Transm.* 1998;105(2–3):287–94.
120. Yoshiaki Omura M. Clinical Significance of Human Papillomavirus Type 16 for Breast Cancer & Adenocarcinomas of Various Internal Organs and Alzheimer's Brain with Increased β -amyloid (1-42); Combined Use of Optimal Doses of Vitamin D3 and Taurine 3 times/day Has Significant. *Acupunct ELECTRO-THERAPEUTICS RES, INT J.* 2016;41:127–34.
121. Javed H, Khan A, Vaibhav K, Moshahid Khan M, Ahmad A, Ejaz Ahmad M, et

- al. Taurine ameliorates neurobehavioral, neurochemical and immunohistochemical changes in sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT) caused by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Neurol Sci.* 2013;34(12):2181–92.
122. Kim HY, Kim H V., Yoon JH, Kang BR, Cho SM, Lee S, et al. Taurine in drinking water recovers learning and memory in the adult APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 2014;4:1–7.
 123. Agca CA, Tuzcu M, Hayirli A, Sahin K. Taurine ameliorates neuropathy via regulating NF- κ B and Nrf2/HO-1 signaling cascades in diabetic rats. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2014;71:116–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.05.023>
 124. Kim C, Cha YN. Taurine chloramine produced from taurine under inflammation provides anti-inflammatory and cytoprotective effects. *Amino Acids.* 2014;46(1):89–100.
 125. Wang GH, Jiang ZL, Fan XJ, Zhang L, Li X, Ke KF. Neuroprotective effect of taurine against focal cerebral ischemia in rats possibly mediated by activation of both GABAA and glycine receptors. *Neuropharmacology.* 2007;52(5):1199–209.
 126. Sun M, Gu Y, Zhao Y, Xu C. Protective functions of taurine against experimental stroke through depressing mitochondria-mediated cell death in rats. *Amino Acids.* 2011;40(5):1419–29.
 127. Sun M, Zhao Y, Gu Y, Xu C. Anti-inflammatory mechanism of taurine against ischemic stroke is related to down-regulation of PARP and NF- κ B. *Amino Acids.* 2012;42(5):1735–47.
 128. Benilova I, Karran E, De Strooper B. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: An emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* [Internet]. 2012;15(3):349–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3028>
 129. De Strooper B, Karran E. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell* [Internet]. 2016;164(4):603–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.056>
 130. Craft JM, Watterson DM, Marks A, Van Eldik LJ. Enhanced susceptibility of S-100B transgenic mice to neuroinflammation and neuronal dysfunction induced by intracerebroventricular infusion of human β -amyloid. *Glia.* 2005;51(3):209–16.
 131. Liu Y, Walter S, Stagi M, Cherny D, Letiembre M, Schulz-Schaeffer W, et al. LPS receptor (CD14): A receptor for phagocytosis of Alzheimer's amyloid peptide. *Brain.* 2005;128(8):1778–89.
 132. Heneka MT, Carson MJ, Khoury J El, Landreth GE, Brosseon F, Feinstein DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.*

2015;14(4):388–405.

133. Furman JL, Sama DM, Gant JC, Beckett TL, Murphy MP, Bachstetter AD, et al. Targeting astrocytes Ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2012;32(46):16129–40.
134. Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Iii JRY, Lafaille JJ, et al. Microglia promote learning-dependent synapse formation through BDNF. 2014;155(7):1596–609.
135. Chen Y, Liang Z, Tian Z, Blanchard J, Dai CL, Chalbot S, et al. Intracerebroventricular streptozotocin exacerbates alzheimer-like changes of 3xTg-AD mice. *Mol Neurobiol*. 2014;49(1):547–62.
136. Teixeira FC, Soares MSP, Blödorn EB, Domingues WB, Reichert KP, Zago AM, et al. Investigating the Effect of Inosine on Brain Purinergic Receptors and Neurotrophic and Neuroinflammatory Parameters in an Experimental Model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2022;59(2):841–55. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02627-z>
137. Teixeira FC, Gutierrez JM, Soares MSP, da Siveira de Mattos B, Spohr L, do Couto CAT, et al. Inosine protects against impairment of memory induced by experimental model of Alzheimer disease: a nucleoside with multitarget brain actions. *Psychopharmacology (Berl)*. 2020;237(3):811–23.
138. Gutierrez JM, Carvalho FB, Schetinger MRC, Marisco P, Agostinho P, Rodrigues M, et al. Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. *Life Sci* [Internet]. 2014;96(1–2):7–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2013.11.014>
139. Haider, Saida; Sajid, Irfan; Batool, Zehra; Madiha, Syeda; Sadir, Sadia; Kamil N et al. Supplementation of Taurine Insulates Against Oxidative Stress, Confers Neuroprotection and Attenuates Memory Impairment in Noise Stress Exposed Male Wistar Rats. *Neurochem Res* [Internet]. 2020;45(11):2762–74. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03127-7>
140. Reeta KH, Singh D, Gupta YK. Chronic treatment with taurine after intracerebroventricular streptozotocin injection improves cognitive dysfunction in rats by modulating oxidative stress, cholinergic functions and neuroinflammation. *Neurochem Int* [Internet]. 2017;108:146–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2017.03.006>
141. Dou JT, Chen M, Dufour F, Alkon DL, Zhao WQ. Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning. *Learn Mem*. 2005;12(6):646–55.
142. Ronaghi A, Zibaii MI, Pandamooz S, Nourzei N, Motamedi F, Ahmadiani A, et al. Entorhinal cortex stimulation induces dentate gyrus neurogenesis through insulin receptor signaling. *Brain Res Bull* [Internet]. 2019;144:75–84. Available

- from: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.11.011>
143. Palmano K, Rowan A, Guillermo R, Guan J, McJarrow P. The role of gangliosides in neurodevelopment. *Nutrients*. 2015;7(5):3891–913.
 144. Gralle M, Labrecque S, Salesse C, De Koninck P. Spatial dynamics of the insulin receptor in living neurons. *J Neurochem*. 2021;156(1):88–105.
 145. Bieberich E. Sphingolipids and lipid rafts: Novel concepts and methods of analysis. *Chem Phys Lipids* [Internet]. 2018;216:114–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.08.003>
 146. Wang K, Shi Y, Liu W, Liu S, Sun MZ. Taurine improves neuron injuries and cognitive impairment in a mouse Parkinson's disease model through inhibition of microglial activation. *Neurotoxicology* [Internet]. 2021;83(August 2020):129–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.01.002>
 147. Kowall NW, Beal MF. Glutamate-, glutaminase-, and taurine-immunoreactive neurons develop neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1991;29(2):162–7.
 148. Du J, Lü W, Wu S, Cheng Y, Gouaux E. Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy. *Nature*. 2015;526(7572):224–9.
 149. Yu J, Zhu H, Lape R, Greiner T, Du J, Lü W, et al. Mechanism of gating and partial agonist action in the glycine receptor. *Cell* [Internet]. 2021;184(4):957–968.e21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.026>
 150. Oh SJ, Lee HJ, Jeong YJ, Nam KR, Kang KJ, Han SJ, et al. Evaluation of the neuroprotective effect of taurine in Alzheimer's disease using functional molecular imaging. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–9.
 151. Toma V AI, Farcas AD, Parvu M, Silaghi-Dumitrescu R, Roman I. CA3 hippocampal field: Cellular changes and its relation with blood nitro-oxidative stress reveal a balancing function of CA3 area in rats exposed to repeated restraint stress. *Brain Res Bull* [Internet]. 2017;130:10–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.12.012>
 152. Azevedo H, Khaled NA, Santos P, Bertonha FB, Moreira-Filho CA. Temporal analysis of hippocampal CA3 gene coexpression networks in a rat model of febrile seizures. *DMM Dis Model Mech*. 2018;11(1).
 153. Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol*. 2007;28(3):138–45.
 154. Gupte R, Christian S, Keselman P, Habiger J, Brooks WM, Harris JL. Evaluation of taurine neuroprotection in aged rats with traumatic brain injury. *Brain Imaging Behav*. 2019;13(2):461–71.
 155. Vargas-Castro V, Gomez-Diaz R, Blanco-Alvarez VM, Tomas-Sanchez C,

- Gonzalez-Vazquez A, Aguilar-Peralta AK, et al. Long-term taurine administration improves motor skills in a tubulinopathy rat model by decreasing oxidative stress and promoting myelination. *Mol Cell Neurosci*. 2021;115(March).
156. Wang K, Zhang B, Tian T, Zhang B, Shi G, Zhang C, et al. Taurine protects dopaminergic neurons in paraquat-induced Parkinson's disease mouse model through PI3K/Akt signaling pathways. *Amino Acids* [Internet]. 2022;54(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03104-6>
 157. Liu K, Zhu R, Jiang H, Li B, Geng Q, Li Y, et al. Taurine inhibits KDM3a production and microglia activation in lipopolysaccharide-treated mice and BV-2 cells. *Mol Cell Neurosci* [Internet]. 2022;122(July):103759. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2022.103759>
 158. Quintas C, Vale N, Gonçalves J, Queiroz G. Microglia P2Y13 receptors prevent astrocyte proliferation mediated by P2Y1 receptors. *Front Pharmacol*. 2018;9(MAY):1–12.
 159. Park JS, Kam TI, Lee S, Park H, Oh Y, Kwon SH, et al. Blocking microglial activation of reactive astrocytes is neuroprotective in models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* [Internet]. 2021;9(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01180-z>
 160. Villarreal A, Vidos C, Monteverde Busso M, Cieri MB, Ramos AJ. Pathological Neuroinflammatory Conversion of Reactive Astrocytes Is Induced by Microglia and Involves Chromatin Remodeling. *Front Pharmacol*. 2021;12(June):1–15.
 161. Zhang H, Wang D, Gong P, Lin A, Zhang Y, Ye RD, et al. Formyl Peptide Receptor 2 Deficiency Improves Cognition and Attenuates Tau Hyperphosphorylation and Astroglia in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis*. 2019;67(1):169–79.
 162. Wartchow KM, Rodrigues L, Swierzy I, Buchfelder M, de Souza DO, Gonçalves CA, et al. Amyloid- β processing in aged s100b transgenic mice is sex dependent. *Int J Mol Sci*. 2021;22(19).
 163. Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agnietti AL, Donato R, Rauvala H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem* [Internet]. 2000;275(51):40096–105. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M006993200>
 164. Ma R hong, Zhang Y, Hong X yue, Zhang J fei, Wang JZ, Liu G ping. Role of microtubule-associated protein tau phosphorylation in Alzheimer's disease. *J Huazhong Univ Sci Technol - Med Sci*. 2017;37(3):307–12.
 165. Langeh U, Singh S. Targeting S100B Protein as a Surrogate Biomarker and its Role in Various Neurological Disorders. *Curr Neuropharmacol*. 2020;19(2):265–77.

166. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O’Keeffe S, et al. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci*. 2014;34(36):11929–47.
167. Farmer WT, Abrahamsson T, Chierzi S, Lui C, Zaelzer C, Jones E V., et al. Neurons diversify astrocytes in the adult brain through sonic hedgehog signaling. *Science* (80-). 2016;351(6275):849–54.
168. Nagao M, Ogata T, Sawada Y, Gotoh Y. Zbtb20 promotes astrocytogenesis during neocortical development. *Nat Commun* [Internet]. 2016;7:1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11102>
169. Zhang Y, Sloan SA, Clarke LE, Caneda C, Plaza CA, Blumenthal PD, et al. Purification and characterization of progenitor and mature human astrocytes reveals transcriptional and functional differences with mouse. *Neuron*. 2016;89(1):37–53.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos subjacentes da melhora cognitiva, regulação neuronal e glial do tratamento com taurina sobre as alterações moleculares, morfológicas e neuroinflamatórias encontradas no modelo de Demência Esporádica do Tipo Alzheimer (DETA), utilizando injeções de estreptozotocina intracerebroventricular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar parâmetros comportamentais de locomoção, bem como a memória de curta e longa duração dos animais;
- b) Observar a memória espacial dos animais por meio da análise da tarefa de labirinto em Y;
- c) Avaliar marcador microglial (Iba-1) nas diferentes regiões do hipocampo (GD, CA1 e CA3);
- d) Investigar marcadores de astrócitos (GFAP, S100 β e SOX-9) e de neurônios adultos (NeuN) nas diferentes regiões do hipocampo (GD, CA1 e CA3);
- e) Verificar a imunorreatividade dos receptores de insulina nas diferentes regiões do hipocampo (GD, CA1 e CA3).

3 ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

Metadata of the article that will be visualized online

ArticleTitle		Neuroprotection elicited by taurine in sporadic Alzheimer-like disease: benefits on memory and control of neuroinflammation in the hippocampus of rats	
Article Copyright - Year		Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023	
Corresponding Author	Family Name	Gutierrez	
	Particle		
	Given Name	Jessié Martins	
	Organization	Federal University of Health Sciences of Porto Alegre	
	Address	Sarmento Leite, 245, Room 514 - Building 3 CEP 90050-170 Porto Alegre RS, Brazil	
	Division	Pathology Research Laboratory	
	Email	jessiegutierrez@gmail.com	
Corresponding Author	Family Name	Fernandes	
	Particle	da	
	Given Name	Marilda C.	
	Organization	Federal University of Health Sciences of Porto Alegre	
	Address	Sarmento Leite, 245, Room 514 - Building 3 CEP 90050-170 Porto Alegre RS, Brazil	
	Division	Pathology Research Laboratory	
	Email	marneuro@ufcspa.edu.br	
Author	Family Name	Huf	
	Particle		
	Given Name	Fernanda	
	Organization	Federal University of Health Sciences of Porto Alegre	
	Address	Sarmento Leite, 245, Room 514 - Building 3 CEP 90050-170 Porto Alegre RS, Brazil	
	Division	Pathology Research Laboratory	
Author	Family Name	Silva	
	Particle	da	
	Given Name	Gabrielle N.	
	Organization	Federal University of Health Sciences of Porto Alegre	
	Address	Sarmento Leite, 245, Room 514 - Building 3 CEP 90050-170 Porto Alegre RS, Brazil	
	Division	Pathology Research Laboratory	

Author	Family Name	Zago	
	Particle		
	Given Name	Adriana M.	
	Organization	Federal University of Health Sciences of Porto Alegre	
	Address	Sarmiento Leite, 245, Room 514 - Building 3 CEP 90050-170 RS, Brazil	Porto Alegre
	Division	Pathology Research Laboratory	
Author	Family Name	Koenig	
	Particle		
	Given Name	Luiz Felipe C.	
	Organization	Federal University of Health Sciences of Porto Alegre	
	Address	Sarmiento Leite, 245, Room 514 - Building 3 CEP 90050-170 RS, Brazil	Porto Alegre
	Division	Pathology Research Laboratory	
Schedule	Received	6 July 2023	
	Revised		
	Accepted	5 October 2023	

Abstract

This study aimed to analyze whether taurine has a nootropic effect on short-term and long-term memory in a model of sporadic dementia of the Alzheimer's type (SDAT). Moreover, we evaluated the immunoreactivity and insulin receptor (IR) distribution and markers for neurons and glial cells in the hippocampus of rats with SDAT and treated with taurine. For this, Male Wistar rats received STZ (ICV, 3 mg/kg, bilateral, 5ul per site, aCFS vehicle) and were treated with taurine (100 mg/kg orally, 1 time per day, saline vehicle) for 25 days. The animals were divided into 4 groups: vehicle (VE), taurine (TAU), ICV-STZ (STZ) and ICV-STZ plus taurine (STZ+TAU). At the end of taurine treatment, short- and long-term memory were assessed by performance on object recognition and Y-maze tasks. Insulin receptor (IR) was evaluated by immunoperoxidase while mature neurons (NeuN), astrocytes (GFAP, S100B, SOX9), and microglia (Iba-1) were evaluated by immunofluorescence. STZ induced worse spatial and recognition memory (INDEX) in YM and ORT tasks. Taurine protected against STZ-induced memory impairment. SDAT reduced the population of mature neurons as well as increased astrocytic and microglial reactivity, and taurine protected against these STZ-induced effects, mainly in the CA1 region of the hippocampus. Taurine increases IR expression in the hippocampus, and protects against the reduction in the density of this receptor in CA1 induced by STZ. In conclusion, these findings demonstrate that taurine is able to enhance memory, up-regulates IR in the hippocampus, protects the neuron population, and reduces the astrogliosis found in SDAT.

Keywords(seperated by –)

Taurine–
Sporadic dementia of Alzheimer's type– Glia–
Memory–
Hippocampus–



Neuroprotection elicited by taurine in sporadic Alzheimer-like disease: benefits on memory and control of neuroinflammation in the hippocampus of rats

Fernanda Huf¹ · Jessié Martins Gutierrez¹ · Gabrielle N. da Silva¹ · Adriana M. Zago¹ · Luiz Felipe C. Koenig¹ · Marilda C. da Fernandes¹

Received: 6 July 2023 / Accepted: 5 October 2023
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

Abstract

This study aimed to analyze whether taurine has a nootropic effect on short-term and long-term memory in a model of sporadic dementia of the Alzheimer's type (SDAT). Moreover, we evaluated the immunoreactivity and insulin receptor (IR) distribution and markers for neurons and glial cells in the hippocampus of rats with SDAT and treated with taurine. For this, Male Wistar rats received STZ (ICV, 3 mg/kg, bilateral, 5ul per site, aCFS vehicle) and were treated with taurine (100 mg/kg orally, 1 time per day, saline vehicle) for 25 days. The animals were divided into 4 groups: vehicle (VE), taurine (TAU), ICV-STZ (STZ) and ICV-STZ plus taurine (STZ + TAU). At the end of taurine treatment, short- and long- term memory were assessed by performance on object recognition and Y-maze tasks. Insulin receptor (IR) was evaluated by immunoperoxidase while mature neurons (NeuN), astrocytes (GFAP, S100B, SOX9), and microglia (Iba-1) were evaluated by immunofluorescence. STZ induced worse spatial and recognition memory (INDEX) in YM and ORT tasks. Taurine protected against STZ-induced memory impairment. SDAT reduced the population of mature neurons as well as increased astrocytic and microglial reactivity, and taurine protected against these STZ-induced effects, mainly in the CA1 region of the hippocampus. Taurine increases IR expression in the hippocampus, and protects against the reduction in the density of this receptor in CA1 induced by STZ. In conclusion, these findings demonstrate that taurine is able to enhance memory, up-regulates IR in the hippocampus, protects the neuron population, and reduces the astrogliosis found in SDAT.

Keywords Taurine · Sporadic dementia of Alzheimer's type · Glia · Memory · Hippocampus

Introduction

Taurine (2-aminoethansulfonic acid) is an amino acid formed by the decarboxylation of cysteine, abundant in animal tissues, especially in heart and brain tissues. Taurine is related to numerous physiological functions such as: maintaining membrane stability, osmoregulation, calcium mobilization, detoxification, neurotransmission, and

anti-inflammatory properties among others [1]. In nervous tissue, taurine is beneficial, having its neuroprotective activity already proven in some models for stroke generated by ischemia and for inflammatory processes [2–4]. In the cerebellum, this compound has shown antiapoptotic activity by suppressing glial cell reactivity [5], as well as protecting neurons and memory in cases of neuropathy caused by hyperglycemia [6].

Alzheimer's disease (AD) is characterized as dementia that progressively alters memory, thinking, and behavior, preventing the individual from performing everyday tasks [7, 8]. The biochemistry of the pathology is complex, involving a deficient vascular system, networks of excitatory and inhibitory neurons, microglia, astroglia, and oligodendrocytes that lose their homeostasis [9].

Astrocytes are versatile glial cells and are widely studied in AD. Astrocytes maintain numerous cytoplasmic

Jessié Martins Gutierrez jessiegutierrez@gmail.com

Marilda C. da Fernandes
marneuro@ufcspa.edu.br; marneuro22@gmail.com

¹ Pathology Research Laboratory, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Sarmiento Leite, 245, Room 514 - Building 3, Porto Alegre CEP 90050-170, RS, Brazil

processes that make contact with synapses in the hippocampus. Their prolongations also come into contact with blood vessels and express receptors for many neurotransmitters. It has been described that these astrocytic extensions have an active role in synapse formation: controlling, regulating, and integrating numerous processes involving glia and neuron [10]. In AD, reactive astroglia are observed, with hypertrophic astrocytes that end up expressing increased glial fibrillary acidic protein (GFAP), as well as calcium-binding protein (S100 β), which when at high levels acts as a pro-inflammatory cytokine exacerbating neuroinflammation, and its increase has been related to AD. Astroglia express an important transcription factor called SOX9, a nuclear marker of adult astrocytes outside the neurogenic region, which allows more objective quantification of the population of adult astrocytes [11–13]. Changes in microglia are also observed in AD. These cells are responsible for phagocytosis and protection in the central nervous system (CNS), being directly related to neuroinflammation. It is known that microglia also maintain the plasticity of neuronal circuits, helping in the remodeling of synapses. When cell death occurs, or deposition of altered proteins, microglia migrate to the site of injury to perform cleaning and phagocytosis, and initiate an innate immune response process, increasing the expression of the ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1) [14, 15]. The association of astrogliosis and increased microglial reactivity results in the production of numerous cytokines, interleukins, nitric oxide, and other potentially cytotoxic molecules. In addition, the presence of β -amyloid plaques exacerbates neuroinflammation, especially in the regions of the hippocampus, responsible for learning and memory [16, 17].

In AD, an impairment in glucose uptake and cerebral metabolism is observed, due to decreased signaling of insulin and glucose transporters in the brain [18]. Streptozotocin (STZ) is a diabetogenic agent used to cause a state of insulin resistance in the nervous tissue of animals, induce neuroinflammation, and even the appearance of amyloid plaques [19]. Based on this evidence, the intracerebroventricular (ICV) administration of STZ has been used as a preclinical model for AD, and mimics the initial stages of sporadic dementia, described as sporadic dementia of the Alzheimer type (SDAT), characterized by a worsening temporary impairment of memory and impairment of brain energy metabolism and changes in hippocampal neuronal populations [19, 20].

Here we investigate the underlying mechanism of cognitive improvement and neuronal and glial regulation by administration of taurine in a pre-clinic model of AD. We showed that taurine recovers memory and protects mature neurons from damage induced by SDAT. Subsequently, taurine improves the neuroinflammation environment in the

hippocampus regulated by glial cells and increases per se the expression of the IR but not in SDAT. These findings implicate taurine protects against cognitive deficits, astrogliosis, and neuroinflammation present in SDAT.

Materials and methods

Chemicals

Taurine, streptozotocin (STZ), albumin, paraformaldehyde, and DAPI di-hydrochloride were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the detailed experiments were of analytical grade and had the highest purity.

Animals

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 488–2016, approved all animal procedures. The use of animals was following the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Scientific Research Activities (DBCA), which is in agreement with the National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA). The animals were handled by international laws for the ethical care and handling of laboratory animals (Guidelines of the Council of the European Communities of 22 September 2010, 2010/63/EU and Law 11.794/08).

Intracerebroventricular Injection of Streptozotocin

The animals were anesthetized with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) for all surgical procedures. The head was placed in position in the stereotaxic apparatus, and a midline sagittal incision was made in the scalp of each animal. The stereotaxic coordinates for the lateral ventricle were measured accurately as anteroposterior – 0.8 mm, lateral 1.5 mm, and dorsoventral – 4.0 mm, relative to the bregma and ventral from the dura with the tooth bar set at 0 mm [21]. Through a skull hole, the piston of a 28-gauge Hamilton® syringe of 10 μ l attached to a stereotaxic apparatus was lowered manually into each lateral .

The SDAT groups received an ICV injection of STZ 3 mg/kg body weight dissolved in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (5 μ l/ventricle). This dose/volume has already been pre-established in previous work of the authors as well as described by other research groups as being effective in the development of the dementia-related cognitive deficit [22, 23]. Vehicle animals received only aCSF (147 mM NaCl; 2.9 mM KCl; 1.6 mM MgCl₂, 1.7 mM CaCl₂, and 2.2 mM dextrose, pH 7.4). After, the animals regained consciousness after the surgery; they were placed back in the housing box with water and food *ad libitum*. During two consecutive days, the animals received analgesic treatment with Ketoprofen i.p. at a dose of 10–20 mg/kg to avoid any painful discomfort.

Taurine treatment

The animals were treated for 25 days with taurine, orally, once a day, at a dose of 100 mg/kg. Taurine was dissolved in 0.9% saline. The vehicle group received only saline solution orally and was administered in a volume equal to 1 ml/kg orally.

The animals were divided into four groups (n = 10 each): vehicle (VE); taurine (TAU, 100 mg/kg), STZ (3 mg/kg), and STZ + taurine (STZ + TAU) (Fig. 1). The body weight of the animals was evaluated weekly during the experimental period. The taurine dose was chosen based on previous studies indicating neuroprotection [5].

Behavioral evaluation

Open-field test

Twenty-one days after the surgical procedure, the locomotor behavioral tests were performed using an open-field apparatus as described previously by Pacheco et al. (2018). The open-field test was realized in an apparatus consisting of a box with the floor of the arena divided into 16 equal squares (18 × 18 cm) and placed in a sound-free room. Animals were placed in the posterior left square and were allowed to freely explore for 5 min. The number of squares crossed with all paws (crossing) was counted manually. The apparatus was cleaned up with a 30% ethanol solution and dried after each rat session. This test was performed to identify

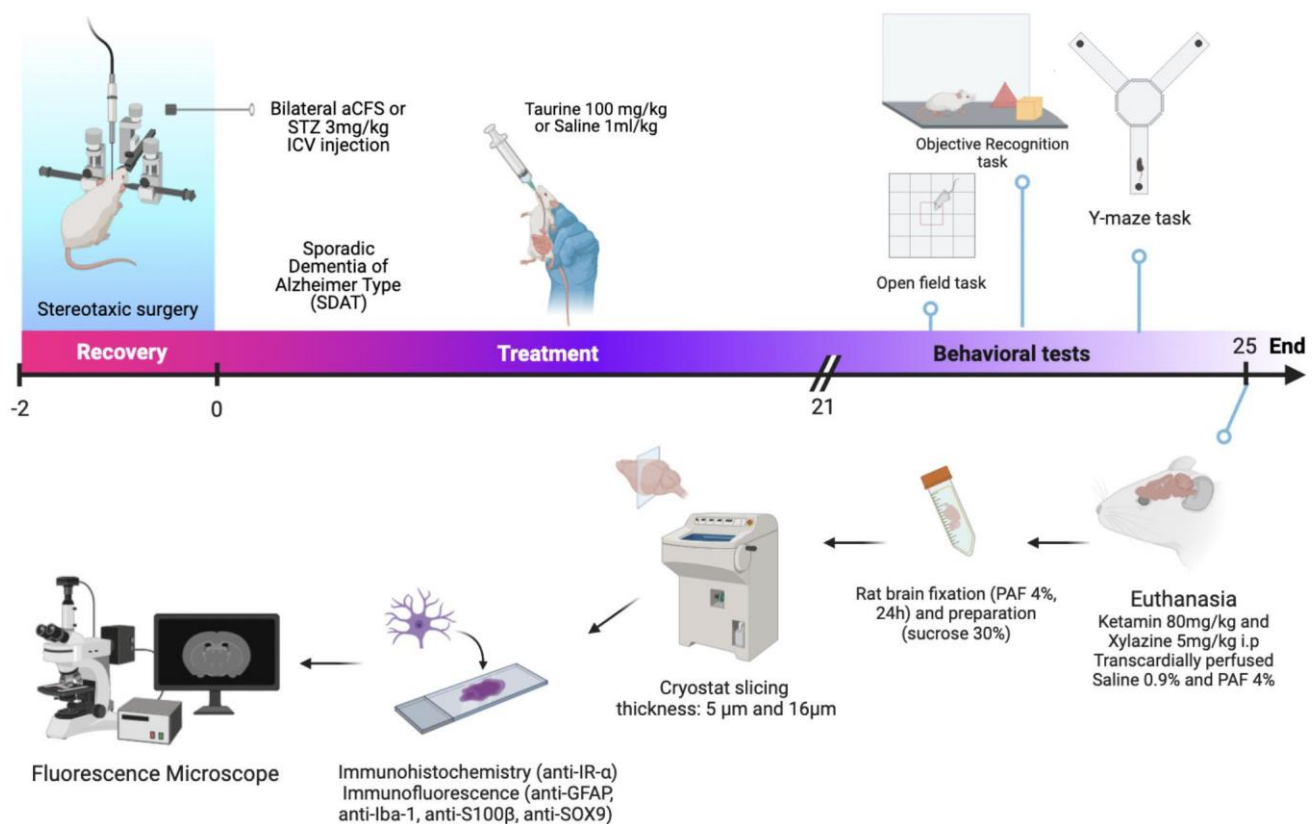


Fig. 1 Scheme of the protocol used to induce the experimental model of sporadic dementia of Alzheimer's type in rats treated for 25 days with taurine (orally, once a day). STZ: streptozotocin; aCSF: artificial cerebrospinal fluid; SDAT: sporadic dementia of Alzheimer's type;

ICV: intracerebroventricular PAF: paraformaldehyde; GFAP: glial fibrillary acidic protein; Iba-1: ionized calcium-binding adapter molecule 1; IR- α : insulin receptor; S100 β : calcium-binding protein; SOX-9: transcription factor 9

motor disabilities that might influence the other behavioral tests performed.

Y-maze test

Spatial memory was evaluated in the apparatus that had three arms: the start arm, in which rats were placed to start to explore (always open); the novel arm, which was blocked during the training session, but open during the test session; and familiar arm (always open). In the training session, the animals were placed in the apparatus on the start arm and were free to explore only the start arm and familiar arm for 5 min. The novel arm remained blocked throughout the training session. After 24 h, the test session was performed with access to the novel arm the animal could freely explore all three arms over a 5-min period.

The apparatus was cleaned with 30% ethanol after each session. The time spent and the number of entries in each arm were determined, and the results were expressed as the number of entries and time spent on the arms [24].

Object recognition test (OR)

The object recognition test (OR) was performed to assess declarative memory in rodents, which is based on the animals' natural tendency to explore the new object more than the familiar one, in a known context [25]. The task was performed in a wooden box 60 cm wide, 60 cm long, and 60 cm high with three walls painted black. The task consisted of habituation, training, and testing sessions. In habituation, the animals were placed in the apparatus to explore freely for 10 min in the absence of objects. Twenty-four hours later, in the training session, the animals were placed, for 10 min, in the presence of two identical objects (objects A1 and A2), where they were positioned on two adjacent sides. Exploration time was determined when the animal touched its nose or came close to the object (at a distance of less than 2 cm). Treatment with the vehicle (saline), taurine (100 mg/kg) was performed 2 h before training. The test session was performed 4 h (short-term memory) and 24 h after training (long-term memory) in the same session, the rats were left for 10 min in the apparatus to explore, and one of the familiar objects used during training was replaced by a new object (object A, B-4 h or C-24 h). All objects are of similar size and odorless plastic, but the color and shape are different for each test. Objects and fields were cleaned with a 30% ethanol solution. The total time spent smelling or touching each object with the nose and/or forepaws and the number of crossing and rearing were recorded. Recognition memory was evaluated by a discrimination index (%), calculated as the difference between the time spent exploring a new object (B or C) and the familiar one (A) x 100, divided by the sum

between the times spent exploring the object new (B or C) and the familiar (A): $[(\text{new T.B or C} - \text{familiar T.A}) / (\text{new T.B or C} + \text{familiar T.A})] / 100$.

Preparation of samples for immunohistochemistry assays

On day 25, 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 post-fixed in 4% PFA (24 h) and transferred to a solution of 30% sucrose in PBS-1% until total submersion [5]. 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% chromalin (chromium and potassium sulfate, from Sigma- Aldrich, Brazil) and finally allowed to dry at room temperature for 24 h. At last, all sections were stored at -20 °C until use.

Immunohistochemistry and immunofluorescence analysis

Firstly, the samples, still frozen, were washed with cold acetone for 10 min, 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 (Tx) for 2 h at room temperature (RT). Sections were incubated with primary antibodies diluted in 5% BSA solution: Rabbit anti-Iba-1 (sections of 16 μm , microglia marker, Abcam Cod. GTX100042) 1:500, overnight at 4 °C, followed by secondary antibody (goat anti-rabbit alexa 555, 1:1,000, 2 h RT in the dark, Thermo Fischer 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 h RT in the dark, Thermo Fischer cod. A21429); Mouse anti-S100 β (sections of 16 μm , astrocyte marker, Abcam cod ab41548) 1:1,000, overnight at 4 °C, followed by secondary antibody (goat anti-rabbit alexa 555, 1:1,000, 2 h RT in the dark, Thermo Fischer cod. A21429); Mouse anti-NeuN (sections of 5 μm , mature neuronal marker, Millipore cod MAB377) 1:6,000, overnight at 4 °C, followed by secondary antibody (goat anti-mouse alexa fluor 488, 1:500, 2 h, RT in the dark, Thermo Fischer cod. A11001); Rabbit anti-SOX-9 (sections of 16 μm , mature astrocyte marker, Abcam cod ab185966) 1:1,000, overnight at 4 °C, followed by secondary antibody

(goat anti-rabbit alexa 555, 1:1,000, 2 h RT in the dark, Thermo Fischer cod. A21429).

The DAPI dihydrochloride solution (1 µg/ml, Sigma Aldrich cod D9542) was prepared in PBS-Tx, and incubation was carried out for 10 min in the dark. Then, the sections were washed 4 times with PBS-Tx for 5 min each. Vectashield (antifade mounting medium) was added over the sections which were then overlaid with a coverslip.

To assess the presence of the insulin receptor in the hippocampus regions rabbit anti-IR (sections of 16 µm, insulin receptor, Abcam cod. ab500) 1:200, was incubated overnight at 4 °C, followed by secondary antibody (goat anti-mouse and anti-rabbit, ready for use, Dako EnVision™

+Dual Link System-HRP cod. K4063). Immunoreactions were developed with 0.06% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Dako®, California, USA, product number: K3468) in PBS-Tx for 5 min and then washed with PBS. Afterward, all samples were dehydrated with ethanol and xylol and mounted on slides with a mounting medium for microscopy Entellan™ (Merk Millipore, Darmstadt, Germany, product number: 107,960).

The images were acquired using a Leica DM6-B microscope, Leica DFC 7000-T camera, and Leica Las X software. Five sections were used for each rat. For each section, 6 images were acquired on the regions of the hippocampus (CA1, CA3, and Dentate Gyrus, 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 densitometry of cells labeled with the aforementioned antibodies. The summarized procedures are in Fig. 1.

Statistical analysis

The normality analysis of the samples was performed by the Kolmogorov-Smirnov test. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test for means comparison using Graph Pad Prism version 5.0 program (Intuitive Software for Science, São Diego, CA, USA). Differences with $P \leq 0.05$ were considered statistically significant in the analysis. All data were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM).

Results

Figure 2 shows the behavioral parameters for spontaneous locomotion (open field task), spatial memory (Y-maze task), and sensorial/recognition memory (novel object recognition

test) (Panel A). Rats treated with TAU and STZ showed no significant differences in the time spent in the center (B) and periphery (C), crossing (D), or rearing (E) for the open field task. Concerning spatial memory (Fig. 2F-G), rats treated with taurine had a significant increase in the number of entries in the novel arm in TAU per se (5.0 ± 0.43 ; $P = 0.0129$) and STZ + TAU (5.0 ± 0.44 ; $P = 0.0221$) when compared to STZ (2.4 ± 0.67 ; $P < 0.05$), but not in comparison to STZ (2.4 ± 0.67 ; $P < 0.05$), *versus* VE (4.0 ± 0.70 ; $P = 0.27$) (Fig. 2F). No significant differences were observed in all groups when time spent in the novel arm was measured (Fig. 2G).

Short-term and long-term memory index values can be seen in Fig. 2H-I, using the novel object recognition task. One-way ANOVA indicated a significant decrease in the short-term memory index in the STZ group (0.0019 ± 0.0007 ; $P < 0.05$) when compared to VE (0.0047 ± 0.0006 ; $P = 0.0345$) and TAU per se (0.0044 ± 0.0003 ; $P = 0.0356$) (Fig. 2H). However, the taurine treatment for 25 days showed a protective effect on the short-term memory index in the STZ + TAU (0.0049 ± 0.0004 ; $P = 0.4520$) *versus* STZ (0.0019 ± 0.0007 ; $P < 0.05$). In Fig. 2I, Tukey's test evidenced a significant difference in long-term memory index between STZ (-0.00053 ± 0.00087 ; $P < 0.05$) *versus* STZ + TAU (0.0050 ± 0.0020 ; $P = 0.0285$). STZ (-0.00053 ± 0.00087 ; $P < 0.05$) *versus* VE (0.0012 ± 0.0010 ; $P = 0.77$); *versus* TAU per se (0.0039 ± 0.00096 ; $P = 0.09$) showed no significant difference (Fig. 2I).

Figure 3 shows the representative images for insulin receptor alpha (IR- α) immunoreactivity (Panel A) in the DG, CA1, and CA3 (Panel B) of rats submitted to SDAT and treated with taurine. Concerning IR- α in DG (Fig. 3C), rats treated with taurine had a significant increase in the immunoreactivity for IR- α between TAU per se (0.16 ± 0.007 ; $P < 0.001$) *versus* STZ (0.11 ± 0.007 ; $P = 0.0009$); *versus* STZ + TAU (0.13 ± 0.008 ; $P = 0.0137$). TAU per se (0.16 ± 0.007 ; $P < 0.001$) *versus* VE (0.13 ± 0.005 ; $P = 0.0909$) showed no significant difference (Fig. 3C). No significant differences were observed between the STZ and STZ + TAU groups. In the CA1 (Fig. 3D), a significant increase in the immunoreactivity for IR- α only in TAU per se (0.16 ± 0.008 ; $P < 0.001$) *versus* STZ (0.099 ± 0.008 ; $P = 0.0031$), but no significant differences were observed between VE (0.13 ± 0.012 ; $P = 0.1499$) or TAU + STZ (0.12 ± 0.010 ; $P = 0.3788$) *versus* STZ. In the CA3 (Fig. 3E), we observed a significant decrease in the immunoreactivity for IR- α between STZ (0.12 ± 0.005 ; $P < 0.05$) *versus* VE (0.14 ± 0.004 ; $P = 0.0256$); *versus* TAU (0.17 ± 0.004 ; $P < 0.0001$). STZ (0.12 ± 0.005 ; $P < 0.05$) *versus* TAU + STZ (0.13 ± 0.007 ; $P = 0.1882$) showed no significant difference. In addition, we observed a significant increase for the IR- α immunoreactivity in TAU per se (0.17 ± 0.004 ; $P < 0.0001$) *versus* TAU + STZ (0.13 ± 0.007 ;

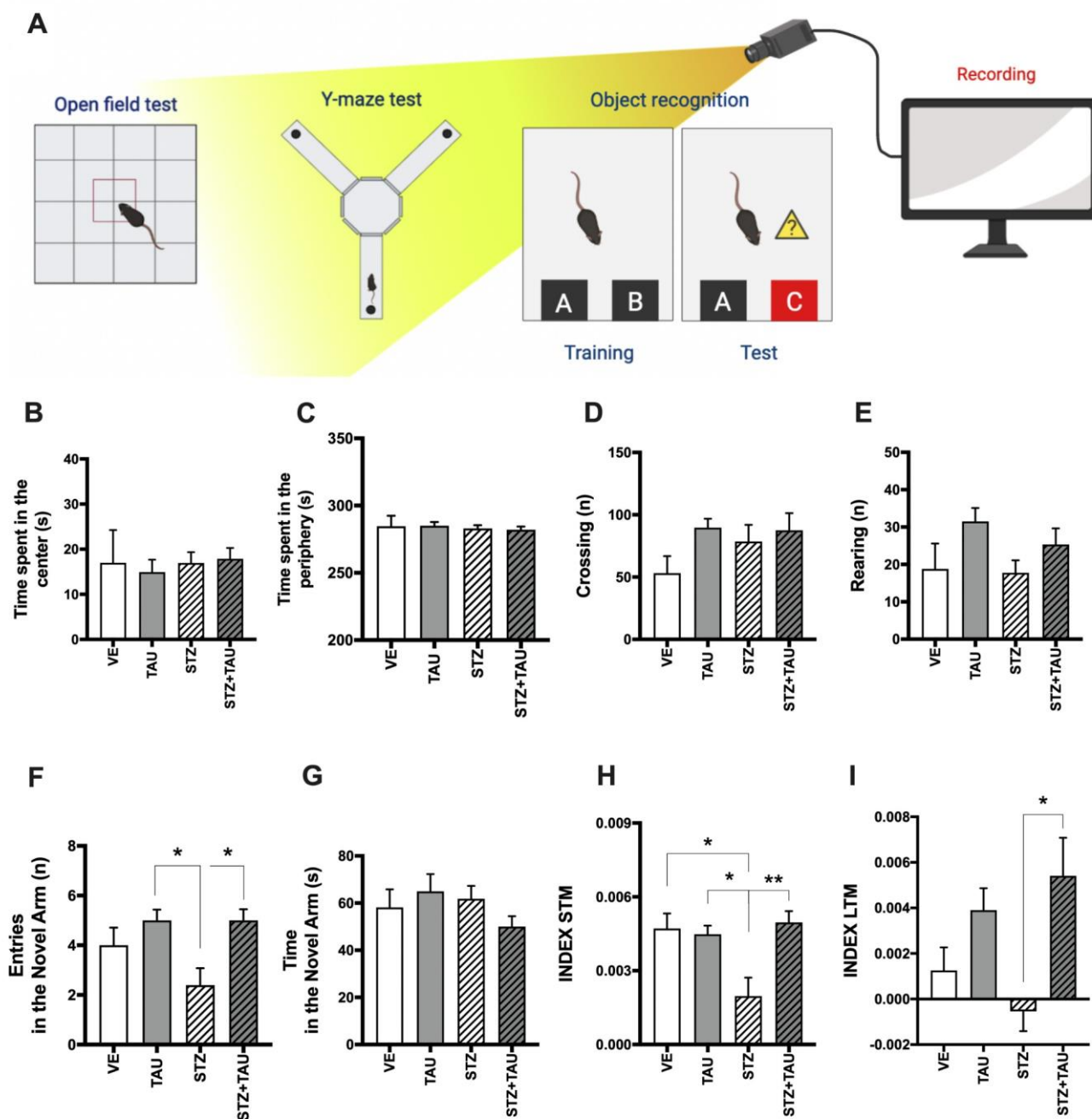


Fig. 2 Effects of treatment with taurine (100 mg/kg) on locomotor activity (evaluated by the open-field task, OF), spatial memory (evaluated by the Y-maze Task), and recognition memory (evaluated by the Object Recognition Task, ORT) in rats with sporadic dementia of the Alzheimer's type (SDAT, STZ 3 mg/kg). ^A illustration of behavioral tasks used; ^B time spent in the center in seconds in OF; ^C time spent in the periphery in seconds in OF; ^D number of crossing in OF;

^E number of rearing in OF; ^F number of entries in the novel arm in the Y-maze task; ^G time spent in the novel arm in the Y-maze task; ^H index for short-term memory (STM) in ORT; ^I index for long-term memory (LTM) in ORT. Statistical significance was determined using a One-way ANOVA (with Tukey post hoc comparison) at * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ ($n = 6-10$ animals per group)

$P = 0.0036$) in the CA3, but not in comparison to the VE (0.13 ± 0.005 ; $P = 0.0989$) (Fig. 3E).

Figure 4 shows the representative images for NeuN immunoreactivity, a convenient marker of post-mitotic

neurons (Panel A), in the regions of the DG, CA1, and CA3 (Panel B) of rats submitted to SDAT and treated with taurine. Concerning NeuN immunoreactivity in DG (Fig. 4C), we observed a significant decrease between STZ (1.39 ± 0.017 ;

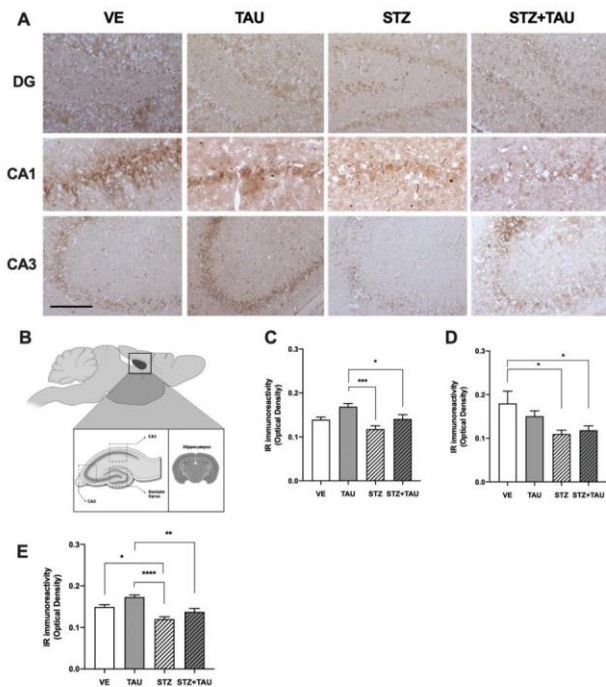


Fig. 3 Effects of treatment with taurine (100 mg/kg) on immunoreactivity for insulin receptor (IR- α) in the hippocampus of rats with sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT, STZ 3 mg/kg). **A** representative image for immunoreactivity of IR in the VE, TAU, STZ, and STZ + TAU groups; **B** representative image of the hippocampus region in relation to the brain; **C** immunohistochemistry staining for IR in DG; **D** immunohistochemistry staining for IR in CA1; **E** immunohistochemistry staining for IR in CA3. Statistical significance was determined using One-way ANOVA (with Tukey post hoc comparison) at * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0001$ when compared with all the groups ($n = 6$ – 10 animals per group)

$P < 0.001$) versus VE (1.57 ± 0.021 ; $P = 0.001$); versus TAU per se (1.52 ± 0.012 ; $P = 0.0048$). STZ (1.39 ± 0.017 ; $P < 0.001$) versus STZ + TAU (1.45 ± 0.031 ; $P = 0.2837$) showed no significant difference. In addition, a significant difference was observed between VE (1.57 ± 0.021 ; $P < 0.01$) versus the STZ + TAU group (1.45 ± 0.031 ; $P = 0.0048$). In the CA1 (Fig. 4D), we observed a significant decrease in the NeuN immunoreactivity in STZ (1.38 ± 0.022 ; $P < 0.001$) versus VE (1.52 ± 0.017 ; $P = 0.0002$), versus TAU per se (1.49 ± 0.018 ; $P = 0.0045$) and versus STZ + TAU (1.46 ± 0.020 ; $P = 0.0499$). In the CA3 (Fig. 4E), we observed a significant decrease in the NeuN immunoreactivity in STZ (1.37 ± 0.014 ; $P < 0.05$) versus VE (1.51 ± 0.019 ; $P < 0.0001$); versus TAU per se (1.48 ± 0.017 ; $P = 0.0007$). STZ (1.37 ± 0.014 ; $P < 0.05$) versus STZ + TAU (1.40 ± 0.010 ; $P = 0.6499$) showed no significant difference. In addition, we observed a significant difference in the NeuN immunoreactivity in STZ + TAU (1.40 ± 0.010 ; $P < 0.05$) versus VE (1.51 ± 0.019 ; $P = 0.011$); and TAU per se (1.48 ± 0.017 ; $P = 0.0111$) (Fig. 4E).

Figure 5 shows representative images for Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1), which is used as a microglial marker (Panel A), in the DG, CA1, and CA3 (Panel B) of rats submitted to SDAT and treated with taurine. With respect to Iba-1 in DG (Fig. 7C), we do not observe a significant difference between groups. In the CA1 (Fig. 5D), we observed a significant increase in Iba-1 immunoreactivity between STZ (0.80 ± 0.010 ; $P < 0.05$) versus VE (0.77 ± 0.005 ; $P < 0.0239$); versus TAU per se (0.73 ± 0.005 ; $P < 0.0001$); versus STZ + TAU (0.77 ± 0.003 ; $P = 0.0347$). In addition, we observed a significant decrease in Iba-1 immunoreactivity between TAU per se (0.73 ± 0.005 ; $P < 0.05$); versus VE (0.77 ± 0.005 ; $P = 0.0087$); versus STZ + TAU (0.77 ± 0.003 ; $P = 0.0035$) (Fig. 5D). In the CA3 (Fig. 5E), we observed a significant increase in the immunoreactivity for Iba-1 immunoreactivity in the STZ (0.80 ± 0.010 ; $P < 0.05$) versus VE (0.77 ± 0.010 ; $P = 0.0483$); versus TAU per se (0.74 ± 0.005 ; $P = 0.0003$); versus STZ + TAU (0.77 ± 0.002 ; $P = 0.0445$).

Figure 6 shows the representative images for GFAP immunoreactivity, an intermediate filament protein in astrocytes (Panel A), in the DG, CA1, and CA3 (Panel B) of rats submitted to SDAT and treated with taurine. Analyzes for optical density for GFAP revealed a significant increase in DG (Fig. 6B) between STZ (1.15 ± 0.094 ; $P < 0.05$) versus VE (0.88 ± 0.11 ; $P = 0.0271$); versus TAU per se (0.89 ± 0.019 , $P = 0.0286$). STZ (1.15 ± 0.094 ; $P < 0.05$) versus STZ + TAU (1.03 ± 0.037 ; $P = 0.4149$) showed no significant difference (Fig. 6C). In the CA1 (Fig. 6D), the GFAP immunoreactivity was significantly increased in the STZ group (1.19 ± 0.11 ; $P < 0.05$) versus VE (0.87 ± 0.019 ; $P = 0.0061$); versus TAU per se (0.91 ± 0.029 ; $P = 0.0092$) or versus STZ + TAU (0.92 ± 0.026 ; $P = 0.0145$) (Fig. 4D). In the CA3 (Fig. 6E), we observed a significant increase in the GFAP immunoreactivity in STZ (1.08 ± 0.079 ; $P < 0.05$) versus VE (0.87 ± 0.021 ; $P = 0.0457$). STZ (1.08 ± 0.079 ; $P < 0.05$) versus TAU per se (0.90 ± 0.028 ; $P = 0.0702$) or versus STZ + TAU (0.96 ± 0.009 ; $P = 0.3102$) showed no significant differences.

Figure 7 shows representative images for S100 β immunoreactivity, a late marker of astrocyte development and characterizing a mature stage (Panel A), in the DG, CA1, and CA3 (Panel B) of rats submitted to SDAT and treated with taurine. With respect to S100 β in the DG (Fig. 7C), we do not observe a significant difference between groups. In the CA1 (Fig. 7D), we observed a significant increase for S100 β immunoreactivity between STZ (0.87 ± 0.012 ; $P < 0.05$) versus VE (0.82 ± 0.012 ; $P = 0.0081$); versus TAU per se (0.83 ± 0.007 ; $P = 0.0070$) or versus STZ + TAU (0.82 ± 0.006 ; $P = 0.0013$). In the CA3 (Fig. 7E), we observed a significant increase in S100 β immunoreactivity in the STZ (0.87 ± 0.013 ; $P < 0.05$) versus the VE group (0.80 ± 0.006 ;

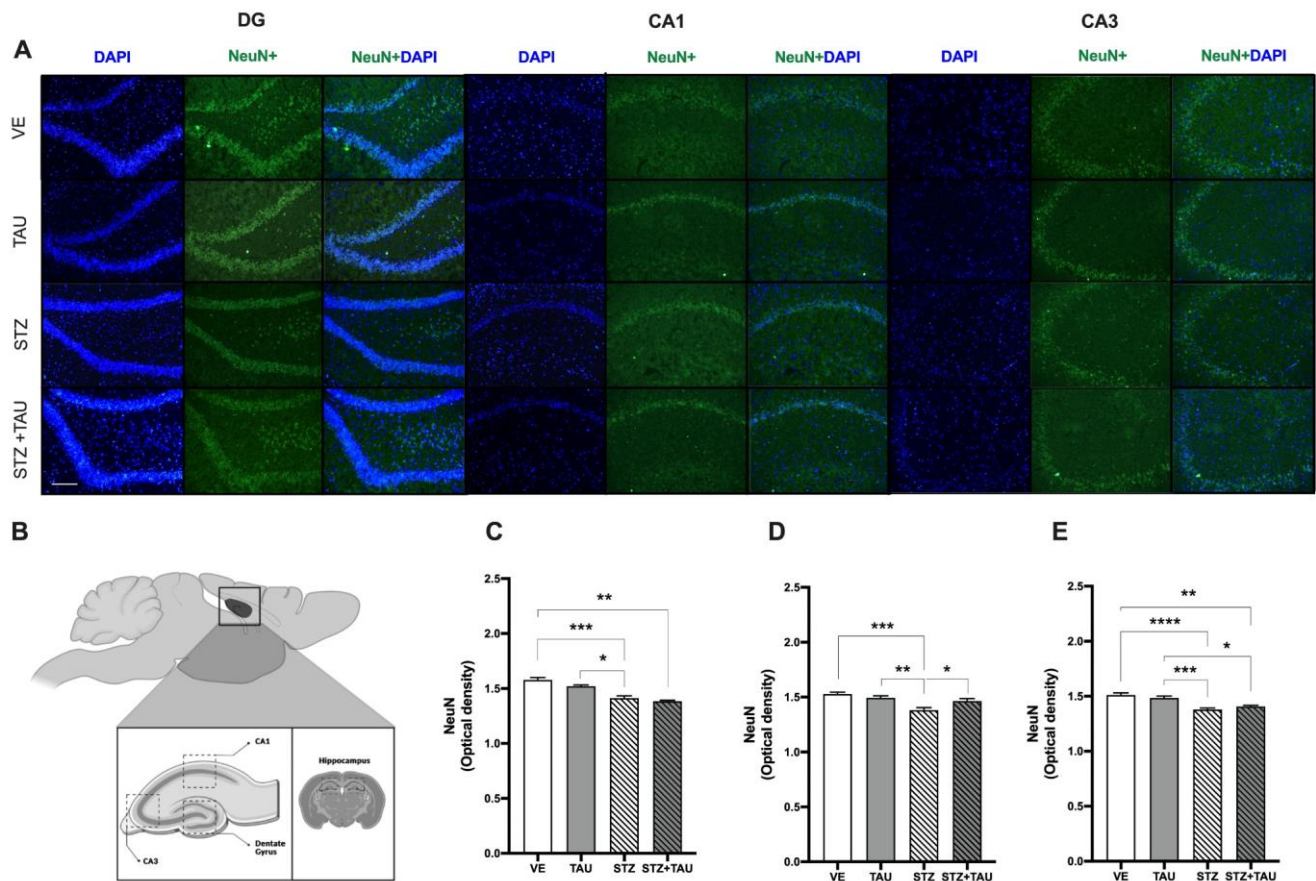


Fig. 4 Effects of treatment with taurine (100 mg/kg) on immunofluorescence for mature neurons staining with anti-NeuN (green) and counterstained with DAPI (blue) in the hippocampus of rats with sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT, STZ 3 mg/kg). ^A representative image for immunoreactivity of anti-NeuN in the different regions of the hippocampus in the VE, TAU, STZ, and STZ + TAU groups; ^B rep-

resentative image of the hippocampus region in relation to the brain; ^C immunostained of NeuN in DG; ^D immunostained of NeuN in CA1; ^E immunostained of NeuN in CA3. Statistical significance was determined using One-way ANOVA (with Tukey post hoc comparison) at * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ when compared with all the groups ($n = 6-10$ animals per group)

$P = 0.0001$); versus TAU per se (0.81 ± 0.005 ; $P = 0.0017$) or versus STZ + TAU (0.82 ± 0.007 ; $P = 0.0052$).

Figure 8 shows representative images for SOX-9 immunoreactivity, a nuclear-specific marker for adult astrocytes (Panel A), in the DG, CA1, and CA3 (Panel B) of rats submitted to SDAT and treated with taurine. Figure 8 C shows the analysis for the optical density of SOX-9 in the DG, we observed a significant increase between STZ (0.94 ± 0.006 ; $P < 0.05$) versus VE (0.82 ± 0.022 ; $P = 0.0119$); versus TAU per se (0.78 ± 0.044 ; $P = 0.0015$); versus STZ + TAU (0.79 ± 0.25 ; $P = 0.0008$). In the CA1 (Fig. 8D), we observed a significant increase for SOX-9 immunoreactivity between STZ (0.95 ± 0.016 ; $P < 0.05$) versus VE (0.82 ± 0.014 ; $P = 0.0114$); versus TAU per se (0.81 ± 0.034 ; $P = 0.0065$); versus STZ + TAU (0.79 ± 0.025 ; $P = 0.0004$). In the CA3 (Fig. 8E), we observed a significant increase for SOX-9 immunoreactivity between STZ (0.95 ± 0.017 ; $P < 0.05$) versus VE (0.82 ± 0.015 ; $P = 0.0260$); versus

TAU per se (0.82 ± 0.035 ; $P = 0.0169$); versus STZ + TAU (0.76 ± 0.032 ; $P = 0.0003$).

Discussion

Taurine is amino acid with many functions in the nervous system. In recent years, many studies have found relevant effects of taurine on cognitive function. This study was conducted to observe the protective effects of taurine on different hippocampal regions, such as the DG, CA1 and CA3, which were affected by the action of intracerebroventricular injections of STZ, a well-established model for the study of SDAT. STZ injections affect brain glucose uptake, generating important metabolic alterations and hippocampal neuro-inflammation, which as a consequence lead to alterations in memory and learning [19].

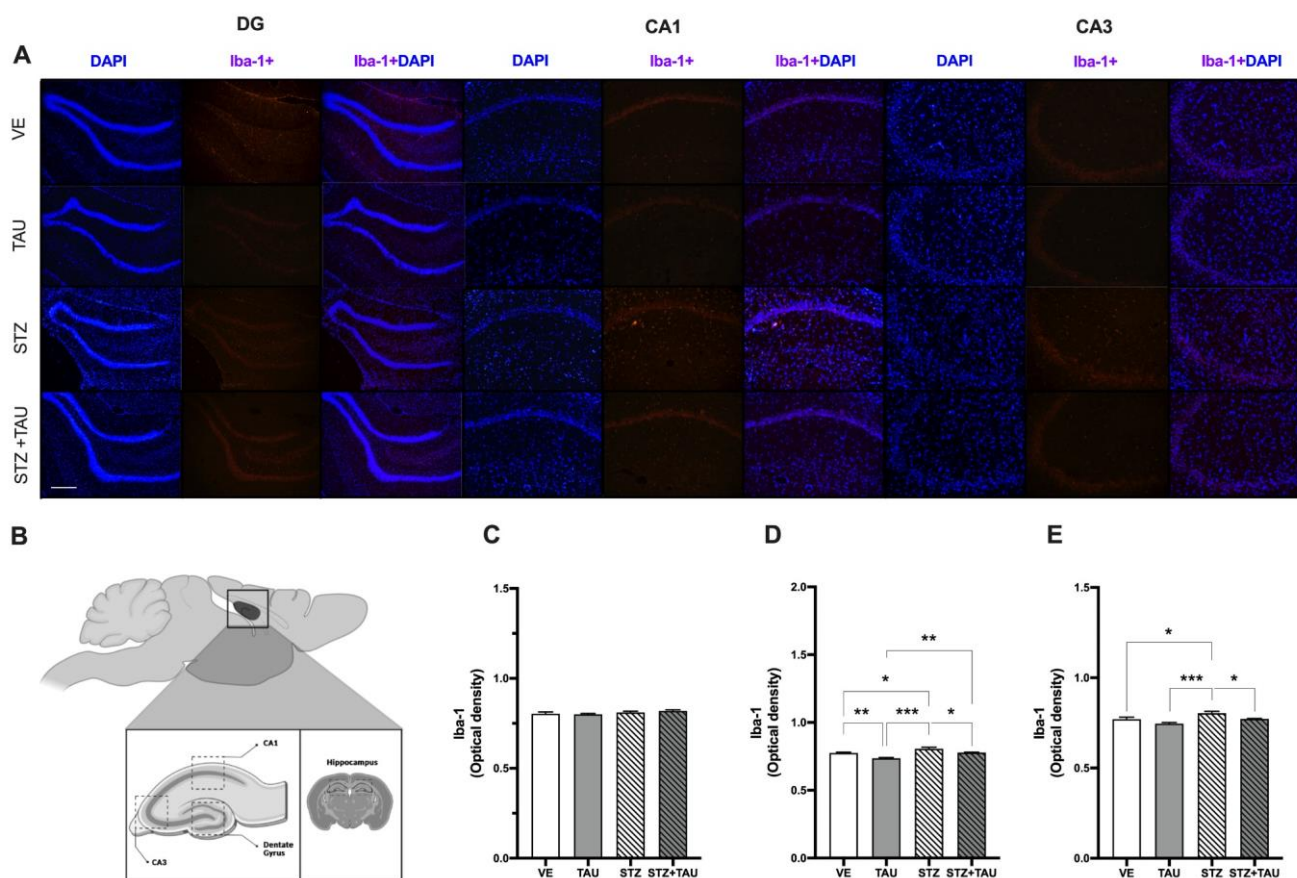


Fig. 5 Effects of treatment with taurine (100 mg/kg) on immunostained microglia with an anti-Iba-1 antibody (magenta) and counterstained with DAPI (blue) in the hippocampus of rats with sporadic dementia of the Alzheimer's type (SDAT, STZ 3 mg/kg). ^A representative image for immunoreactivity of anti-Iba-1 in the DG, CA1, and CA3 regions of the hippocampus in the VE, TAU, STZ, and STZ + TAU groups;

^B representative image of the hippocampus region in relation to the brain; ^C immunostained of Iba-1 in DG; ^D immunostained of Iba-1 in CA1; ^E immunostained of Iba-1 in CA3. Statistical significance was determined using One-way ANOVA (with Tukey post hoc comparison) at * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ when compared with all the groups ($n = 6-10$ animals per group)

In the behavioral tests performed, we found no significant difference regarding the locomotion activity. However, with respect to spatial memory assessed in the Y-maze task, it is possible to suggest that taurine has a positive effect on spatial memory. Besides, our results also showed that short- and long-term declarative memory was improved by the action of taurine in comparison to SDAT animals. Taurine has also been investigated for the improvement of psychiatric disorders in animals, such as memory problems associated with noise, where similar data for long-term memory were found by Haider et al.(2020) [26]. Javed et al.(2013), also shown that taurine can reverse memory deficits in mice in the Morris water maze test in SDAT animals. Reeta et al. (2017) showed that taurine protects against memory loss caused by ICV-STZ, showing that treated mice improved performance in memory behavioral tasks [27, 28]. The cited authors report that taurine is involved in mechanisms related to a decrease in oxidative stress in nervous tissue, thereby

improving local neuroinflammation and consequently spatial and aversive memory impaired by SDAT [27, 28]. The SDAT causes changes in IR, leading a desensitization of them and compromising cerebral glucose uptake and energy metabolism in a prolonged manner [27]. Neurogenesis, which drives the formation of new neurons, happens in adults mainly in the subgranular region (SGZ) of the DG and is associated with the action of insulin signaling [29, 30]. It is worth noting that the neuronal IR may be affected by the more complex morphology of neurons compared to cells of classical insulin target organs, as well as the wide variety of lipids unique to the cell membranes of the nervous system [31]. Insulin also has a neuroprotective effect, assisting synaptic plasticity, memory production, and consolidation. IR are more expressed in neurons than in glial cells, and in regions such as the hippocampus, amygdala, hypothalamus, entorhinal cortex, and olfactory bulb, IR levels are affected in learning and memory processes [29, 30]. Some

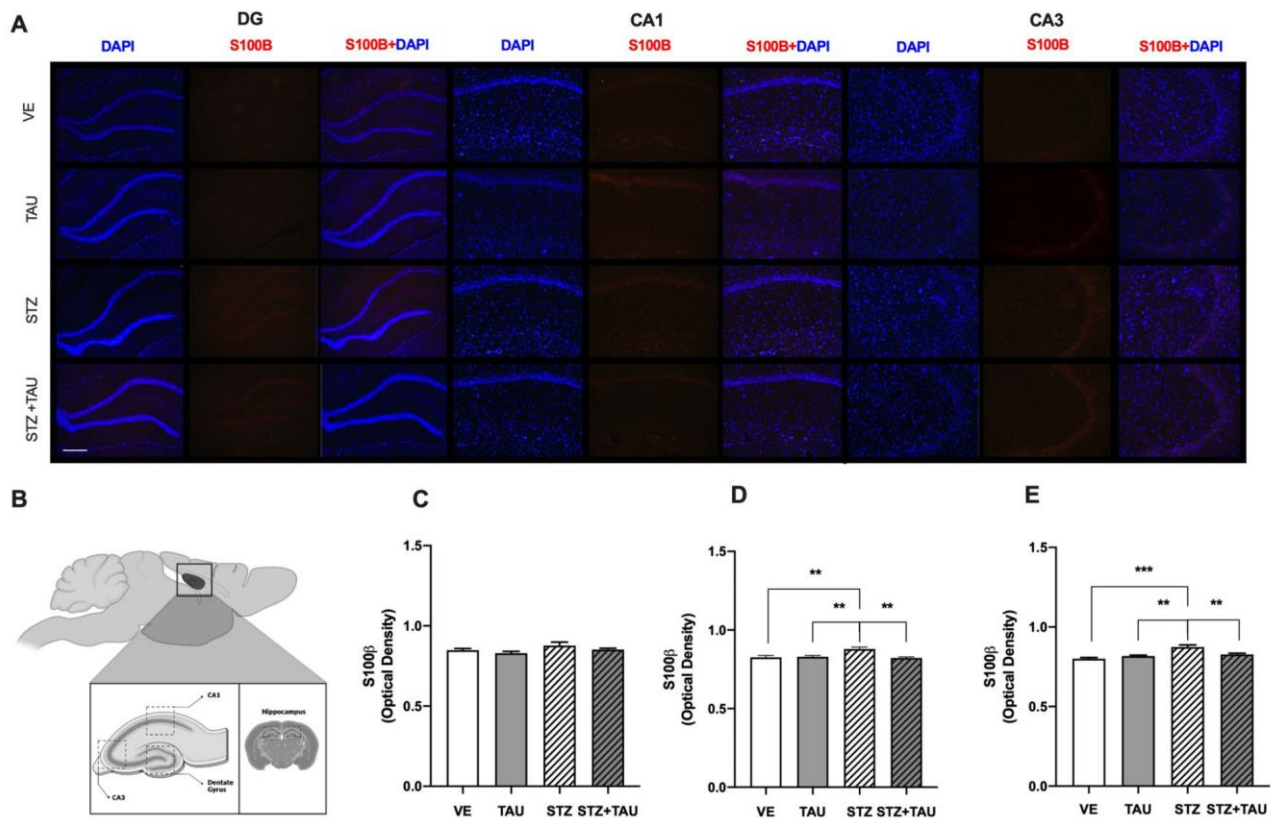


Fig. 7 Effects of treatment with taurine (100 mg/kg) on immunostained with an anti-S100 β antibody (red) and counterstained with DAPI (blue) in the hippocampus of rats with sporadic dementia of the Alzheimer's type (SDAT, STZ 3 mg/kg). **A** representative image for immunoreactivity of anti-S100 β in the DG, CA1, and CA3 regions of the hippocampus in the VE, TAU, STZ, and STZ + TAU groups;

B representative image of the hippocampus region in relation to the brain; **C** immunostained of S100 β in DG; **D** immunostained of S100 β in CA1; **E** immunostained of S100 β in CA3. Statistical significance was determined using a One-way ANOVA (with Tukey post hoc comparison) at $**P < 0.01$ when compared with all the groups ($n = 6-10$ animals per group)

studies have shown that taurine can regulate insulin signaling, since taurine intake improves the endocrine function of the pancreas, increasing overall insulin production and, in response, there is an increase in the expression and excitability of insulin receptors in the hippocampal region [32]. Our results corroborate these findings, since we showed that taurine per se increased immunoreactivity for IR- α . However, STZ seems to reverse this regulatory effect on IR- α immunoreactivity in the STZ + TAU group.

In the analysis of mature neuron populations, our findings show a reduction in the density of NeuN-labelled cells in SDAT animals. However, the protective effect of taurine was observed only in the CA3 region. In agreement, Wang et al. (2021) observed that taurine was important to increase NeuN density in the hippocampus of rats exposed to paraquat, a classical model to induce Parkinson's disease (PD) in animals [33]. Glutamatergic pyramidal neurons found in the cornu ammonis showed co-localization for glutamate, glutaminase and taurine [34]. In addition, taurine may reduce glutamatergic currents via its role as a partial agonist for

glycine receptors [35, 36]. Indeed, Se Jong Oh et al. (2020) showed that taurine increased uptake of the metabolic glutamate receptor type 5 in hippocampal pyramidal neurons, contributing in the protection against glutamatergic excitotoxicity in 5xFAD transgenic mice [37]. The relay role of the CA3 field in the trisynaptic circuitry of the hippocampus is well established [38], has anatomical features that are ideal to allow CA3 to act as a self-associative network and an input balancing area in hippocampal formation, but the effects of taurine or SDAT animals on this region are still poorly understood. It is worth noting that CA3 neuronal networks play a crucial role in memory information processes, and temporal analysis in ventral CA3 showed several transcriptomic changes related to inflammation, neuronal differentiation and synaptic transmission [39]. Remembering that the model using intracerebroventricular injections of STZ causes changes in glucose uptake and thus generates an imbalance in hippocampal brain metabolism, producing many reactive oxygen species, which causes the release of numerous cytokines by the microglia,

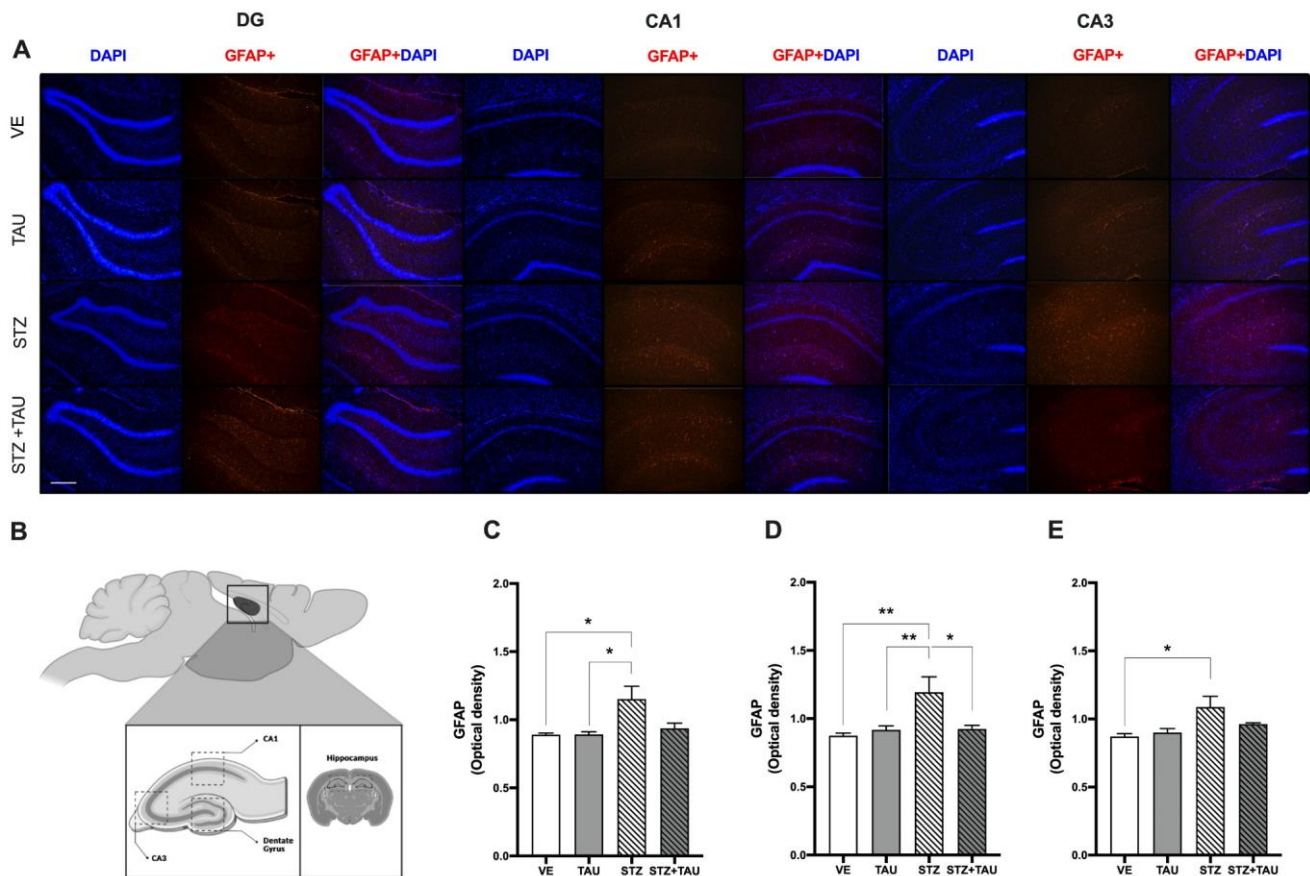


Fig. 6 Effects of treatment with taurine (100 mg/kg) on immunostained astrocytes with an anti-GFAP antibody (red) and counterstained with DAPI (blue) in the hippocampus of rats with sporadic dementia of the Alzheimer's type (SDAT, STZ 3 mg/kg). ^A representative image for immunoreactivity of anti-GFAP in the DG, CA1, and CA3 regions of the hippocampus in the VE, TAU, STZ, and STZ + TAU groups; ^B rep-

resentative image of the hippocampus region in relation to the brain; ^C immunostained of GFAP in DG; ^D immunostained of GFAP in CA1; ^E immunostained of GFAP in CA3. Statistical significance was determined using a One-way ANOVA (with Tukey post hoc comparison) at * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ when compared with all the groups ($n = 6-10$ animals per group)

generating neuroinflammation [28]. The microglia are considered the first line of defense of the CNS, actively functioning against environmental disturbances and contributing to local homeostasis. With activation of the microglia against tissue insults, reactive astrogliosis occurs [40]. Thus, showing an intimate relationship between microglia and astrocytes, which in turn have already been described as cells with immune characteristics and receptors, thus contributing to the innate and adaptive immune responses in the CNS, besides performing many other functions already mentioned. In neuroinflammation, there is bidirectional communication between astrocytes and microglia, and one can activate the other [41]. After some insults, astrocytes undergo changes in the expression of multiple factors and modulate microglial phenotypes and functions through the production of cytokines, chemokines, calcium, complement proteins, and other inflammatory mediators, which can affect microglial functions such as activation, migration,

and phagocytosis. On the other hand, the microglia can activate astrocytes, which in turn develop two different phenotypes' phenotype 1 (A1), which is considered destructive to nerve cells, and phenotype 2 (A2), which is considered neuroprotective and reparative [40] [42].

Our finding evaluating the Iba-1 marker showed an increase in microglia reactivity in CA1 and CA3 regions, but not in DG hippocampus in SDAT animals. However, taurine treatment for 25 days played an important role in inhibiting the activation of microglia cells and perhaps could reduce the release of inflammatory factors. As an endogenous amino acid, taurine has long been recognized for its anti-inflammatory and neuroprotective effects [5, 43-45]. In addition, it has been reported that taurine depletion causes activation of microglia, emphasizing its protective role against neuroinflammation [44]. Liu et al. (2022) showed that taurine in vitro inhibited LPS-induced generation of inflammatory factors and increased ROS intensity

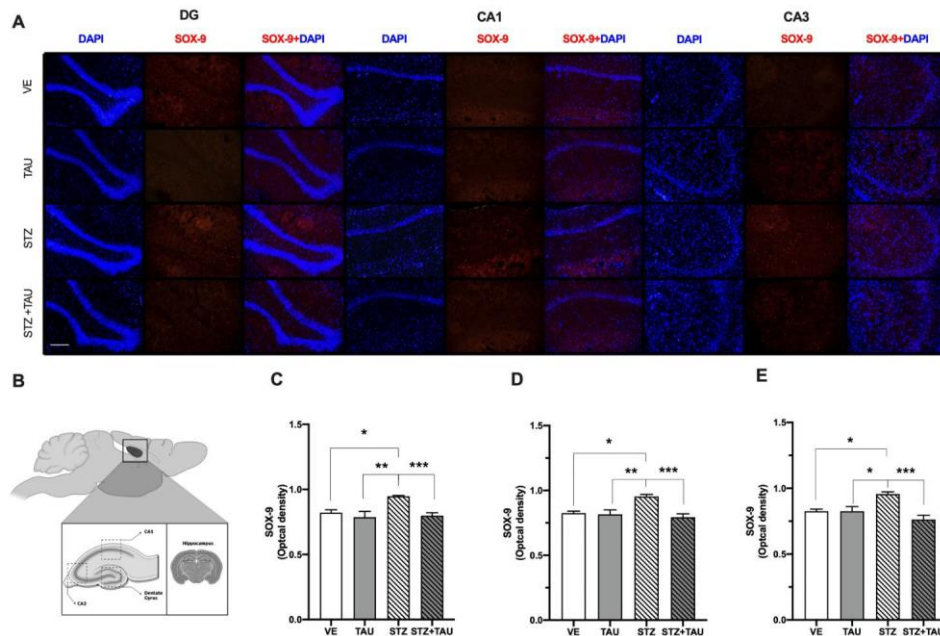


Fig. 8 Effects of treatment with taurine (100 mg/kg) on immunostained with an anti-SOX-9 antibody (red) and counterstained with DAPI (blue) in the hippocampus of rats with sporadic dementia of the Alzheimer's type (SDAT, STZ 3 mg/kg). ^A representative image for immunoreactivity of anti-SOX-9 in DG, CA1, and CA3 regions of the hippocampus in the VE, TAU, STZ, and STZ + TAU groups; ^B repre-

sentative image of the hippocampus region in relation to the brain; ^C immunostained of SOX-9 in DG; ^D immunostained of SOX-9 in CA1; ^E immunostained of SOX-9 in CA3. Statistical significance was determined using One-way ANOVA (with Tukey post hoc comparison) at * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ when compared with all the groups ($n = 6$ –10 animals per group)

in BV-2 cells. The same authors demonstrated that taurine inhibited microglial lysine demethylase 3a (KDM3a), promoting relief of microglia activation in LPS-treated mice [46]. Wang et al. (2021) also evaluated the immunoreactivity of Iba-1 in the hippocampus of rats with PD treated with taurine, noting that taurine was able to reduce the immunoreactivity of the microglia in these animals. The authors comment that one of the mechanisms that taurine uses to perform neuroprotection is through the inactivation of the microglia in the neuroinflammatory environment [33]. Since only the CA1 and CA3 regions were responsive to taurine treatment against the microglial reactivity insult provoked by STZ, it is possible to suggest from our findings that the microglia were more sensitive in responding in these regions. In addition, the DG region may possibly be associated with a delay in the anti-inflammatory feedback directed at the SDAT group and the animals that received taurine treatment, since the neuroinflammation, proliferation and survival of new cells in dentate gyrus of mammals, whether neurons or glial cells, is a complex process that is subject to numerous influences.

Considering that microglia are the main source of pro-inflammatory cytokines, they are believed to be key participants in the development of astrogliosis. Before the astrocyte response, the inflammatory reaction is initiated by

an increase in microglia-derived mediators and activation of microglia [47]. Park et al. (2021) believe that activation of the NF- κ B signaling cascade by resident microglia increases the potential to convert resting astrocytes into reactive astrocytes, which may lead to pathophysiological transformation of astrocytes in a variety of neurodegenerative disorders, such as PD and AD disease, and preventing activation of the microglia-astrocyte activation circuit may help prevent these diseases [48]. Our data corroborate with other studies pointing to intense astrogliosis in SDAT rodents [49, 50] and interestingly taurine regulates this process, since both in DG and CA1 there was a reversal of the astrogliosis promoted by ICV-STZ.

The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the use of taurine have quite controversial results, Kim and Cha (2014) in an experimental model with double transgenic mice (APP/PS1) for AD that took doses of taurine in water observed an increase in GFAP expression in taurine-treated animals [1]. Su et al. (2014) showed that after head trauma with intense inflammation and treatment with taurine for 7 days, GFAP immunoreactivity in the hippocampus was reduced, indicating that taurine reduces local neuroinflammation in the trauma model [51]. To extend the analyzes on astrocytes, we evaluated other complementary markers, such as the labeling of reactive astrocytes using

calcium-binding protein β (S100 β) and a nuclear marker of astrocytes such as transcription factor 9 (SOX-9).

Our results demonstrate that in CA1 and CA3 regions SDAT animals show a significant increase in S100 β compared to that of the other groups, and taurine-treated animals reverted this effect. At nanomolar concentrations, S100 β conveys neuroprotective and neurotrophic properties, while at higher concentrations it has been associated with deleterious effects, and may form the basis of neurodegenerative diseases such as AD [52, 53]. Besides, S100 β effects are mediated through the receptor for advanced glycation end products (RAGE) [52] and a persistent RAGE activation causes neuronal death as a result of increased production of reactive oxygen species [54] it is possible to suppose that antioxidant effects of taurine may also be related to a reduction in S100 β found in taurine-treated animals. S100 β is also associated with cellular aging, where higher concentrations of the protein have been observed in the hippocampus and cortex related to age-related activation of astrocytes, which would aid in age-related cognitive deficits, and any imbalance in the regulation of S100 β protein is a direct cause of hyperphosphorylation of tau, a common finding in the nervous tissue of AD patients [55, 56]. Intracellularly, S100B, as a calcium-sensing protein, is known to regulate a variety of activities, transferring second messenger signals and interacting with different molecules in different cell types [57]. In particular, S100B intervenes in cell proliferation, survival and differentiation [58, 59], participates in the regulation of cellular calcium homeostasis and enzymatic activities [60–63], but the data available to date do not allude to a clearly defined role or function in relation to different regions of the hippocampus. In our study, we found no significant difference in the DG region for S100 β immunoreactivity. Although there are a few studies that have shown that the DG region is less susceptible to oxidative stress [64] compared to CA1 and CA3, it is possible to assume that these discrepancies found could be attributed to different concentrations of S100B (toxic) produced by STZ in the DG region that were not able to cause changes in S100 β immunoreactivity.

Previous studies have suggested that the transcription factor SOX9 is highly enriched in astrocytes [65–68]. Sun et al. (2017) reported that comparisons of the transcriptomes of SOX9⁺ cells and glutamate-transporting astrocytic cells (GLT1) indicated that these two markers had a large overlap in gene expression. Like other currently used astrocytic markers, SOX9 specifically targets astrocytes outside neurogenic regions. However, SOX9 also had several advantages in this regard, including the fact that its expression does not decrease with age or functional status, that the use of a nuclear marker of the astrocytic phenotype allows a more conservative assessment of the astrocytic phenotype

than the previous one using cytoplasmic markers [13]. Our findings showed that for all regions of the hippocampus, SDAT animals obtained a considerable increase in immunoreactivity for SOX-9. Interestingly, SDAT animals treated with taurine showed a significant reduction in SOX-9, that in fact, taurine can regulate astrogliosis both by evaluating a cytoplasmic marker for astrocytes (GFAP) and nuclear and this reveals that possible neuroprotective mechanisms of taurine can be associated with a reduction in astrocyte reactivity. However, despite these findings, the increase in SOX-9 found in SDAT animals in the DG may be associated with neural precursors of the astroglial lineage within the neurogenic zones, perhaps pointing to a compensation in the balance of new astrocyte formation once that marked reactive astrogliosis exists in these animals.

Overall, we found that taurine is able to improve spatial memory and both short and long-term episodic memory, increase adult neuronal population, considerably inhibit microglial activation and control astrogliosis in the hippocampus of animals with SDAT.

Acknowledgements The authors are grateful for all the support offered by the technician of the Pathology Research Laboratory, Teresinha Stein.

Author contributions F.H, A.M.Z, G.N.S and J.M.G performed stereotactic surgery, drug preparation and animal care; G.N.S and F.H performed behavioral tests; F.H, A.M.Z and G.N.S performed immunofluorescence assays; M.C.F, F.H and L.F.K performed the optical density microscopic analysis; J.M.G, M.C.F and F.H wrote the main text of the manuscript and J.M.G and F.H prepared scheme 1 and Figs. 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7. All authors reviewed the manuscript.

Declarations

Competing interests The authors declare no competing interests.

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. Gutierrez was supported by the National Postdoctoral Program (PNPD/CAPES).

References

- Kim C, Cha YN (2014) Taurine chloramine produced from taurine under inflammation provides anti-inflammatory and cytoprotective effects. *Amino Acids* 46:89–100. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1545-6>
- Wang GH, Jiang ZL, Fan XJ et al (2007) Neuroprotective effect of taurine against focal cerebral ischemia in rats possibly mediated by activation of both GABAA and glycine receptors.

- Neuropharmacology 52:1199–1209. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.10.022>
3. Sun M, Gu Y, Zhao Y, Xu C (2011) Protective functions of taurine against experimental stroke through depressing mitochondria-mediated cell death in rats. *Amino Acids* 40:1419–1429. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0751-8>
 4. Sun M, Zhao Y, Gu Y, Xu C (2012) Anti-inflammatory mechanism of taurine against ischemic stroke is related to down-regulation of PARP and NF- κ B. *Amino Acids* 42:1735–1747. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0885-3>
 5. Silva SP, Zago AM, Carvalho FB et al (2021) Neuroprotective Effect of Taurine against Cell Death, Glial Changes, and Neuronal Loss in the Cerebellum of Rats Exposed to Chronic-Recurrent Neuroinflammation Induced by LPS. *J Immunol Res* 2021:. <https://doi.org/10.1155/2021/7497185>
 6. Rahmeier FL, Zavalhia LS, Tortorelli LS et al (2016) The effect of taurine and enriched environment on behaviour, memory and hippocampus of diabetic rats. *Neurosci Lett* 630:84–92. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.07.032>
 7. Möller H-J, Graeber MB (1998) The case described by Alois Alzheimer in 1911. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 248:111–122. <https://doi.org/10.1007/s004060050027>
 8. Benilova I, Karran E, De Strooper B (2012) The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* 15:349–357. <https://doi.org/10.1038/nn.3028>
 9. De Strooper B, Karran E (2016) The Cellular phase of Alzheimer's Disease. *Cell* 164:603–615. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.056>
 10. Allen NJ (2014) Astrocyte regulation of synaptic behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30:439–463. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013053>
 11. Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
 12. Craft JM, Watterson DM, Marks A, Van Eldik LJ (2005) Enhanced susceptibility of S-100B transgenic mice to neuroinflammation and neuronal dysfunction induced by intracerebroventricular infusion of human β -amyloid. *Glia* 51:209–216. <https://doi.org/10.1002/glia.20194>
 13. Sun W, Cornwell A, Li J et al (2017) SOX9 is an astrocyte-specific nuclear marker in the adult brain outside the neurogenic regions. *J Neurosci* 37:4493–4507. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3199-16.2017>
 14. Liu Y, Walter S, Stagi M et al (2005) LPS receptor (CD14): a receptor for phagocytosis of Alzheimer's amyloid peptide. *Brain* 128:1778–1789. <https://doi.org/10.1093/brain/awh531>
 15. Heneka MT, Carson MJ, Khoury J, El et al (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 14:388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
 16. Furman JL, Sama DM, Gant JC et al (2012) Targeting astrocytes ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 32:16129–16140. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2323-12.2012>
 17. Parkhurst CN, Yang G, Ninan I et al (2014) Microglia promote learning-dependent synapse formation through BDNF. *Neuron* 82:1596–1609. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.030>
 18. Chen Y, Liang Z, Tian Z et al (2014) Intracerebroventricular streptozotocin exacerbates alzheimer-like changes of 3xTg-AD mice. *Mol Neurobiol* 49:547–562. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8539-y>
 19. Grünblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J et al (2007) Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J Neurochem* 101:757–770. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04368.x>
 20. Kamat PK, Kalani A, Rai S et al (2016) Streptozotocin Intracerebroventricular-Induced neurotoxicity and brain insulin resistance: a therapeutic intervention for treatment of sporadic Alzheimer's Disease (sAD)-Like Pathology. *Mol Neurobiol* 53:4548–4562. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9384-y>
 21. Teixeira FC, Soares MSP, Blödmern EB et al (2022) Investigating the Effect of Inosine on Brain Purinergic receptors and neurotrophic and neuroinflammatory parameters in an experimental model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 59:841–855. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02627-z>
 22. Teixeira FC, Gutierrez JM, Soares MSP et al (2020) Inosine protects against impairment of memory induced by experimental model of Alzheimer disease: a nucleoside with multitarget brain actions. *Psychopharmacology* 237:811–823. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05419-5>
 23. Gutierrez JM, Carvalho FB, Schetinger MRC et al (2014) Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. *Life Sci* 96:7–17. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.11.014>
 24. Pacheco SM, Soares MSP, Gutierrez JM et al (2018) Anthocyanins as a potential pharmacological agent to manage memory deficit, oxidative stress and alterations in ion pump activity induced by experimental sporadic dementia of Alzheimer's type. *J Nutr Biochem* 56:193–204. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.02.014>
 25. Dodart JC, Mathis C, Ungerer A (1997) Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice. *NeuroReport* 8:1173–1178. <https://doi.org/10.1097/00001756-199703240-00023>
 26. Haider S, Sajid I, Batool Z, Madiha S, Sadir S, Kamil N et al (2020) Supplementation of Taurine insulates against oxidative stress, confers Neuroprotection and attenuates memory impairment in noise stress exposed male Wistar rats. *Neurochem Res* 45:2762–2774. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03127-7>
 27. Javed H, Khan A, Vaibhav K et al (2013) Taurine ameliorates neurobehavioral, neurochemical and immunohistochemical changes in sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT) caused by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Neurol Sci* 34:2181–2192. <https://doi.org/10.1007/s10072-013-1444-3>
 28. Reeta KH, Singh D, Gupta YK (2017) Chronic treatment with taurine after intracerebroventricular streptozotocin injection improves cognitive dysfunction in rats by modulating oxidative stress, cholinergic functions and neuroinflammation. *Neurochem Int* 108:146–156. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.03.006>
 29. Dou JT, Chen M, Dufour F et al (2005) Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning. *Learn Mem* 12:646–655. <https://doi.org/10.1101/lm.88005>
 30. Ronaghi A, Zibaii MI, Pandamooz S et al (2019) Entorhinal cortex stimulation induces dentate gyrus neurogenesis through insulin receptor signaling. *Brain Res Bull* 144:75–84. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.11.011>
 31. Palmano K, Rowan A, Guillermo R et al (2015) The role of gangliosides in neurodevelopment. *Nutrients* 7:3891–3913. <https://doi.org/10.3390/nu7053891>
 32. El Idrissi A (2019) Taurine regulation of neuroendocrine function. *Adv Exp Med Biol* 1155:977–985. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8023-5_81
 33. Wang K, Shi Y, Liu W et al (2021) Taurine improves neuron injuries and cognitive impairment in a mouse Parkinson's disease model through inhibition of microglial activation. *Neurotoxicology* 83:129–136. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.01.002>
 34. Kowall NW, Beal MF (1991) Glutamate-, glutaminase-, and taurine-immunoreactive neurons develop neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 29:162–167. <https://doi.org/10.1002/ana.410290208>

35. Du J, Lü W, Wu S et al (2015) Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy. *Nature* 526:224–229. <https://doi.org/10.1038/nature14853>
36. Yu J, Zhu H, Lape R et al (2021) Mechanism of gating and partial agonist action in the glycine receptor. *Cell* 184:957–968e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.026>
37. Oh SJ, Lee HJ, Jeong YJ et al (2020) Evaluation of the neuroprotective effect of taurine in Alzheimer's disease using functional molecular imaging. *Sci Rep* 10:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72755-4>
38. Toma V, Al, Farcas AD, Parvu M et al (2017) CA3 hippocampal field: Cellular changes and its relation with blood nitro-oxidative stress reveal a balancing function of CA3 area in rats exposed to repeated restraint stress. *Brain Res Bull* 130:10–17. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.12.012>
39. Azevedo H, Khaled NA, Santos P et al (2018) Temporal analysis of hippocampal CA3 gene coexpression networks in a rat model of febrile seizures. *DMM Dis Model Mech* 11. <https://doi.org/10.1242/dmm.029074>
40. Jha MK, Jo M, Kim JH, Suk K (2019) Microglia-Astrocyte Crosstalk: an intimate Molecular Conversation. *Neuroscientist* 25:227–240. <https://doi.org/10.1177/1073858418783959>
41. Farina C, Aloisi F, Meinel E (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 28:138–145. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.01.005>
42. Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B (2015) Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 16:358–372. <https://doi.org/10.1038/nrn3880>
43. Gupte R, Christian S, Keselman P et al (2019) Evaluation of taurine neuroprotection in aged rats with traumatic brain injury. *Brain Imaging Behav* 13:461–471. <https://doi.org/10.1007/s11682-018-9865-5>
44. Vargas-Castro V, Gomez-Diaz R, Blanco-Alvarez VM et al (2021) Long-term taurine administration improves motor skills in a tubulinopathy rat model by decreasing oxidative stress and promoting myelination. *Mol Cell Neurosci* 115. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2021.103643>
45. Wang K, Zhang B, Tian T et al (2022) Taurine protects dopaminergic neurons in paraquat-induced Parkinson's disease mouse model through PI3K/Akt signaling pathways. *Amino Acids* 54:1–11. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03104-6>
46. Liu K, Zhu R, Jiang H et al (2022) Taurine inhibits KDM3a production and microglia activation in lipopolysaccharide-treated mice and BV-2 cells. *Mol Cell Neurosci* 122:103759. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2022.103759>
47. Quintas C, Vale N, Gonçalves J, Queiroz G (2018) Microglia P2Y13 receptors prevent astrocyte proliferation mediated by P2Y1 receptors. *Front Pharmacol* 9:1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00418>
48. Park JS, Kam TI, Lee S et al (2021) Blocking microglial activation of reactive astrocytes is neuroprotective in models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* 9:1–15. <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01180-z>
49. Villarreal A, Vidos C, Monteverde Busso M et al (2021) Pathological Neuroinflammatory Conversion of reactive astrocytes is Induced by Microglia and involves chromatin remodeling. *Front Pharmacol* 12:1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.689346>
50. Zhang H, Wang D, Gong P et al (2019) Formyl peptide receptor 2 Deficiency improves cognition and attenuates tau hyperphosphorylation and astrogliosis in a mouse model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* 67:169–179. <https://doi.org/10.3233/JAD-180823>
51. Su Y, Fan W, Ma Z et al (2014) Taurine improves functional and histological outcomes and reduces inflammation in traumatic brain injury. *Neuroscience* 266:56–65. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.02.006>
52. Donato R, Sorci G, Riuzzi F et al (2009) S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1793:1008–1022. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.11.009>
53. Wartchow KM, Rodrigues L, Swierzy I et al (2021) Amyloid- β processing in aged s100b transgenic mice is sex dependent. *Int J Mol Sci* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms221910823>
54. Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G et al (2000) Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem* 275:40096–40105. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006993200>
55. Ma Rhong, Zhang Y, Hong X, Yue et al (2017) Role of microtubule-associated protein tau phosphorylation in Alzheimer's disease. *J Huazhong Univ Sci Technol - Med Sci* 37:307–312. <https://doi.org/10.1007/s11596-017-1732-x>
56. Langeh U, Singh S (2020) Targeting S100B protein as a surrogate biomarker and its role in various neurological Disorders. *Curr Neuropharmacol* 19:265–277. <https://doi.org/10.2174/1570159x18666200729100427>
57. Michetti F, D'Ambrosi N, Toesca A et al (2019) The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury. *J Neurochem* 148:168–187. <https://doi.org/10.1111/jnc.14574>
58. Shimamoto S, Tsuchiya M, Yamaguchi F et al (2014) Ca²⁺/S100 proteins inhibit the interaction of FKBP38 with Bcl-2 and Hsp90. *Biochem J* 458:141–152. <https://doi.org/10.1042/BJ20130924>
59. Li D, Li K, Chen G et al (2016) S100B suppresses the differentiation of C3H/10T1/2 murine embryonic mesenchymal cells into osteoblasts. *Mol Med Rep* 14:3878–3886. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5697>
60. Tsoporis JN, Overgaard CB, Izhar S, Parker TG (2009) S100B modulates the hemodynamic response to norepinephrine stimulation. *Am J Hypertens* 22:1048–1053. <https://doi.org/10.1038/ajh.2009.145>
61. Wen XH, Duda T, Pertzev A et al (2012) S100B serves as a Ca²⁺ sensor for ROS-GC1 guanylate cyclase in cones but not in rods of the murine retina. *Cell Physiol Biochem* 29:417–430. <https://doi.org/10.1159/000338496>
62. Agam G, Almog O (2015) Calbindin D28k and S100B have a similar interaction site with the lithium-inhibitable enzyme inositol monophosphatase-1: a new drug target site. *J Med Chem* 58:2042–2044. <https://doi.org/10.1021/jm5019324>
63. Gógl G, Alexa A, Kiss B et al (2016) Structural basis of ribosomal S6 kinase 1 (RSK1) inhibition by S100B protein: modulation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling cascade in a calcium-dependent way. *J Biol Chem* 291:11–27. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.684928>
64. Lee SG, Yoo DY, Jung HY et al (2015) Neurons in the hippocampal CA1 region, but not the dentate gyrus, are susceptible to oxidative stress in rats with streptozotocin-induced type 1 diabetes. *Neural Regen Res* 10:451–456. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.153695>
65. Zhang Y, Chen K, Sloan SA et al (2014) An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci* 34:11929–11947. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014>
66. Farmer WT, Abrahamsson T, Chierzi S et al (2016) Neurons diversify astrocytes in the adult brain through sonic hedgehog signaling. *Sci* (80-) 351:849–854. <https://doi.org/10.1126/sci-ence.aab3103>
67. Nagao M, Ogata T, Sawada Y, Gotoh Y (2016) Zbtb20 promotes astrocytogenesis during neocortical development. *Nat Commun* 7:1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms11102>
68. Zhang Y, Sloan SA, Clarke LE et al (2016) Purification and characterization of progenitor and mature human astrocytes reveals transcriptional and functional differences with mouse.

Neuron 89:37–53.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.013>.

Purification

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

4 CONCLUSÕES

Os resultados são consistentes para afirmar que o modelo experimental de demência esporádica do tipo Alzheimer induzida com a injeção ICV de STZ foi capaz de provocar alterações na memória e neuroinflamação características da DA, nas regiões do hipocampo estudadas (GD, CA1 e CA3), o que está de acordo com a literatura, mostrando ser um modelo eficaz para o estudo da doença.

Além disso, a taurina administrada via gavagem não afetou a atividade locomotora dos animais, mas mostrou-se eficiente, melhorando a memória espacial, bem como tendo um efeito protetor na memória sensorial de longo e curto prazo, observada no reconhecimento de objetos pelos animais expostos ao modelo.

A taurina também foi capaz de aumentar a imunorreatividade do RI nas diferentes regiões do hipocampo e exerceu efeitos protetores sobre neurônios maduros principalmente na região do CA1.

Com relação às alterações gliais, ficou evidente a reatividade apresentada pela glia no modelo experimental. Nesse sentido, a taurina conseguiu diminuir a imunorreatividade evidenciada pelos astrócitos. Também foi importante para diminuir a imunorreatividade de Iba-1 marcador de micróglia, principalmente nas regiões CA1 e CA3.

Assim observa-se que a taurina tem uma ação benéfica sobre a memória e diminui a neuroinflamação importante na DA.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo faz parte de um projeto maior intitulado “O papel e a dinâmica morfofuncional do hipocampo: efeitos da taurina nos aspectos comportamentais, bioquímicos e histológicos em modelos animais para a doença de Alzheimer”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEUA) da UFCSPA (Parecer N° 620/19) (Anexo).

Nesse grande projeto, realizamos o modelo experimental de demência esporádica do tipo Alzheimer, descrito nesta tese, e também um modelo de amnésia com o uso de escopolamina. Os dois modelos foram planejados como projeto de doutorado, porém o modelo de amnésia está na fase de análise estatística dos dados, para posterior confecção de um artigo para a divulgação científica dos resultados encontrados.

O estudo baseou-se no fato de a taurina ser um aminoácido abundante no corpo humano e ter efeitos importantes em diferentes órgãos e sistemas. Estudos anteriores do nosso grupo revelaram que esse aminoácido tem efeitos importantes no SNC.

ANEXO – 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: 241/18 Parecer 620/19

2) DATA DO PARECER: 13/03/2019

3) TÍTULO DO PROJETO:

O papel e a dinâmica morfofuncional do hipocampo: Efeitos da Taurina nos aspectos comportamentais, bioquímicos e histológicos em modelos animais para a doença de Alzheimer

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Marilda da Cruz Fernandes

5) RESUMO DO PROJETO:

Evidências sugerem que a taurina desempenha funções biológicas importantes como molécula anti-inflamatória, antiarritmica, reguladora dos canais iônicos, entre outras. Essa situação indica que a taurina pode ser utilizada como neuroprotetor, apresentando-se como uma nova alternativa que contribuirá na prevenção dos déficits cognitivos induzidos pela doença de Alzheimer. Assim, nesse estudo serão avaliadas as possíveis alterações morfológicas e neuroquímicas no hipocampo, principalmente relacionadas aos mecanismos de reparo celular, bem como investigar alterações imuno-histoquímicas em células gliais e neuronais, baseado em um bloqueio da neurotransmissão colinérgica e nas funções hipocámpicas a partir da administração de estreptozotocina intracerebroventricular em animais, sendo esse, um modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer (DETA). Nesse modelo será avaliada a ação neuroprotetora da taurina em dos protocolos experimentais de amnésia induzida por escopolamina e em um modelo experimental para o desenvolvimento de DETA.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Investigar alterações bioquímicas, moleculares e morfológicas no desenvolvimento de neurônios imaturos e adultos e a arquitetura de células da macróglia do hipocampo de animais submetidos a dos modelos experimentais para a doença de Alzheimer que pioraram a sinalização colinérgica bem como verificar se a taurina atua como composto neuroprotetor e anti-amnésico.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

7) FINALIDADE DO PROJETO: ☐ Ensino ☒ Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título ☒ Adequado ☐ Comentários

Introdução ☒ Adequada ☐ Comentários

Objetivos ☒ Adequados ☐ Comentários

Relevância e Justificativa ☒ Adequados ☐ Comentários

Materiais e Métodos ☒ Adequados ☐ Comentários

Cronograma para execução da pesquisa ☒ Adequado ☐ Comentários

Orçamento e fonte financiadora ☒ Adequados ☐ Comentários

Referências Bibliográficas ☒ Adequadas ☐ Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

☒ Sim ☐ Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B ☐ C ☐ D ☒ E ☐

Justifique:

No projeto serão executados procedimentos cirúrgicos invasivos conduzidos em animais anestesiados

Espécie:

Número Amostral:

Redução Amostral:

☐ Sim ☒ Não

Justifique:



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Substituição de Metodologia:

☐ Sim

☒ Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia:

☐ Sim

☒ Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais:

☒ Adequada

☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais:

☒ Adequada

☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável):

☒ Adequada

☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Ver comentários

Anestesia dos animais (se aplicável):

☒ Adequada

☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Ver comentários

Eutanásia dos animais (se aplicável):

☒ Adequada

☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Labotatório):

Outra instituição. Qual?

UFCSPA Biotério



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
	Rattus norvegicus	M	220

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

- ☒ Aprovado
- ☐ Com Pendência
- ☐ Não aprovado

Data de início 07/09/2018 Data de Término 07/09/2022

Comentários gerais sobre o projeto:

Não há.