

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

Jéssica Hauschild Taday

**Investigação do papel dos astrócitos nas fases iniciais da doença de Alzheimer:  
curcumina como estratégia protetora e avaliação dos seus mecanismos moleculares**

Porto Alegre

2024

Jéssica Hauschild Taday

**Investigação do papel dos astrócitos nas fases iniciais da doença de Alzheimer:  
curcumina como estratégia protetora e avaliação dos seus mecanismos moleculares**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Bioquímica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marina Concli Leite

Porto Alegre

2024

### CIP - Catalogação na Publicação

Taday, Jéssica Hauschild  
Investigação do papel dos astrócitos nas fases  
iniciais da doença de Alzheimer: curcumina como  
estratégia protetora e avaliação dos seus mecanismos  
moleculares / Jéssica Hauschild Taday. -- 2024.  
152 f.  
Orientadora: Marina Concli Leite.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. astrócitos. 2. neurodegeneração. 3. Alzheimer.  
4. curcumina. I. Leite, Marina Concli, orient. II.  
Título.

Aos meus pais, que fizeram de suas histórias de  
vida minha maior inspiração.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Antônio, que desde cedo me apoiou, incentivou e ensinou. À minha mãe, Dulce, que transformou seus desafios em lições de valorização da educação, sendo minha maior fonte de inspiração e motivação.

Ao meu irmão, Jeferson, pelo apoio, força e carinho sempre. Ao meu afilhado, Davi, que tem o poder de me fazer sorrir mesmo nos piores momentos.

À toda minha família pelo suporte ao longo desses anos.

Aos colegas de laboratório, pelo grupo incrível que formamos. À Marina S. e ao Gabriel, que me guiaram no momento mais desafiador do trabalho. À Fê Fróes, pela inspiração como pós-graduanda, que me ensinou tanto durante estes anos. À Jé Souza, pela parceria desde o início da iniciação científica. Ao Jéfeli, por sempre estar presente e ajudar em tudo. E à Lívia, que chegou recentemente e já se dedica tanto.

Ao CA, por sempre estar disposto a estender a mão em todos os momentos. E ao Lab 33, em especial à Adri, Vanessa e Vitor, pelas trocas enriquecedoras, não só científicas, mas também pelo apoio emocional e pelo companheirismo diário.

À Marina L., que me orientou durante meus 10 anos no Lab 31M, servindo de exemplo e inspiração profissional e pessoal. Agradeço por confiar em meu trabalho, por cada conversa e por todo o apoio ao longo dessa jornada acadêmica.

## RESUMO

As doenças neurodegenerativas são condições complexas e multifatoriais, frequentemente diagnosticadas em estágios avançados, quando os sintomas já são graves. Entretanto, anos antes do aparecimento dos sintomas, o sistema nervoso central apresenta condições como prejuízo na sinalização de insulina, disfunções no metabolismo de glicose, neuroinflamação e aumento da deposição de proteínas, como o peptídeo  $\beta$ -amiloide na doença de Alzheimer (DA). A DA é a forma mais comum de neurodegeneração, mas, apesar do extensivo conhecimento sobre suas características fisiopatológicas e sintomas clínicos, os mecanismos iniciais de seu desenvolvimento ainda não são completamente compreendidos. Os astrócitos, células importantes para a manutenção da homeostase cerebral, têm se destacado no contexto do estudo das doenças neurodegenerativas, exercendo um papel crucial desde suas fases iniciais. Dado o desafio do diagnóstico precoce e a importância de compreender as alterações iniciais na DA, a identificação de novos alvos terapêuticos que intervenham nesses estágios é fundamental. Nesse contexto, a curcumina, um polifenol presente na *Curcuma longa*, emerge como uma molécula promissora, devido a sua capacidade de atuar em múltiplos alvos e potenciais efeitos contra amiloidogênese, inflamação e estresse oxidativo no cérebro. Por este motivo, este trabalho teve como objetivo avaliar as alterações iniciais da DA *in vivo* e *in vitro*, bem como o potencial papel preventivo da curcumina nesses estágios. Inicialmente, buscando entender o papel dos astrócitos nos mecanismos iniciais associados à neurodegeneração, induzimos algumas dessas alterações em culturas de astrócitos, como o prejuízo do metabolismo energético, utilizando metilglioal (MG), que induz a um aumento de reações de glicação ou fluorocitrato (FC), um inibidor da produção de ATP em astrócitos; a neuroinflamação, utilizando lipopolissacarídeo (LPS); e também utilizamos a estreptozotocina (STZ), uma indutor de modelo animal da DA. Nossos resultados mostraram que nessas condições os astrócitos têm suas funções alteradas, contribuindo para a progressão de distúrbios cerebrais como os observados na DA. Além disso, os resultados da STZ *in vitro* sugerem que ela é um modelo adequado para o estudo do papel dos astrócitos na DA. Ao explorar as fases iniciais do modelo animal da DA induzido por STZ e utilizando a curcumina como estratégia preventiva para alterações iniciais, observamos que, após uma semana da injeção de STZ não houve déficit cognitivo, mas foram observadas alterações em funções características de astrócitos, bem como alterações na via do PPAR $\gamma$ , quando comparados com 4 semanas após a administração de STZ. A curcumina, por sua vez, desempenhou um papel protetor majoritariamente nas fases iniciais do modelo, após 1 semana da indução, via um mecanismo que envolve, ao menos em parte, a regulação de PPAR $\gamma$ . Por fim, utilizando o modelo *in vitro* da STZ, confirmamos a importante ação da curcumina na via do PPAR $\gamma$  nas células astrocíticas no contexto inicial da DA. Nossos resultados evidenciam a importância dos astrócitos e da via do PPAR $\gamma$  nas fases iniciais da DA, além de sugerir a curcumina como uma candidata potencial para estratégias preventivas e para o desenvolvimento de novos fármacos baseados em sua estrutura para o tratamento da DA.

## ABSTRACT

Neurodegenerative diseases are complex and multifactorial conditions, diagnosed mostly in advanced stages when symptoms become severe. However, years before symptoms manifest, conditions such as impaired insulin signaling, disruptions in glucose metabolism, neuroinflammation, and increased protein deposition can be found in the central nervous system such as  $\beta$ -amyloid in Alzheimer's disease (AD). AD is the most common form of neurodegeneration, but the initial mechanisms of its development remain incompletely understood, despite extensive knowledge of its pathophysiological characteristics and clinical symptoms. Astrocytes, essential cells for maintaining cerebral homeostasis, have been pivotal in neurodegenerative disease research, playing a crucial role from the early stages of AD. With the challenge of early diagnoses, it is imperative to understand the initial changes in AD, identifying new therapeutic targets. In this context, curcumin, a polyphenol found in *Curcuma longa*, emerges as a promising molecule due to its ability to act on multiple targets and potential effects against amyloidogenesis, inflammation, and oxidative stress in the brain. For this reason, this study aimed to evaluate early AD changes *in vivo* and *in vitro* and the potential preventive role of curcumin in these stages. First, to understand the role of astrocytes in the initial mechanisms associated with the neurodegeneration processes we induced some of these alterations in cultured astrocytes, such as energy metabolism, using methylglyoxal (MG) which induces increased glycation reactions, or fluorocitrate (FC), an inhibitor of ATP production in astrocytes; neuroinflammation using lipopolysaccharide (LPS); and streptozotocin (STZ), which induces an animal model of AD. Our findings indicate that these conditions alter astrocyte functions, contributing to the progression of brain disorders like AD. Additionally, results from the STZ *in vitro* model suggest its suitability for studying the role of astrocytes in AD. After that, exploring the early stages of the STZ-induced AD animal model and using curcumin as a preventive strategy for these initial changes, we did not observe cognitive deficits one week post-STZ injection, but animals showed changes in astrocyte functions and the PPAR $\gamma$  pathway. In this condition, curcumin demonstrated a protective role in the early stages of the model, possibly through PPAR $\gamma$  regulation. Finally, using the *in vitro* STZ model, we confirmed the significant action of curcumin on the PPAR $\gamma$  pathway in astrocytic cells in the early AD context. These results highlight the importance of astrocytes and the PPAR $\gamma$  pathway in the early stages of AD, while suggesting curcumin as a potential candidate for preventive strategies and in the development of new drugs for treating AD.

## Sumário

Lista de abreviaturas .....	2
1. Introdução .....	5
1.1. Doenças Neurodegenerativas .....	5
1.2. Doença de Alzheimer .....	5
1.2.1. Peptídeo $\beta$ -amiloide .....	7
1.2.2. Proteína tau.....	9
1.2.3. Modelo de DA esporádica induzido por estreptozotocina (STZ).....	10
1.3. Astrócitos na DA.....	11
1.4. Fases iniciais da DA.....	15
1.5. Terapias .....	18
1.6. Curcumina.....	19
1.6.1. Características físico-químicas da curcumina .....	19
1.6.2. Farmacocinética da curcumina .....	20
1.6.3. Curcumina na DA.....	22
1.6.4. Ação via PPAR $\gamma$ .....	23
2. Justificativa .....	25
2.1. Objetivo geral.....	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
3. Resultados .....	26
3.1. Capítulo I.....	26
3.2. Capítulo II .....	43
4. Discussão.....	98
4.1. Disfunção de astrócitos em alterações associadas a neurodegeneração .....	98
4.2. Modelo de DA induzido <i>in vitro</i> em astrócitos .....	103
4.3. STZ causa alterações antes do dano cognitivo.....	104
4.4. Curcumina previne alterações iniciais da DA em modelo <i>in vivo</i> induzido por STZ .....	109
4.5. Curcumina atua na via do PPAR $\gamma$ em astrócitos.....	115
5. Conclusão.....	119
6. Perspectivas futuras.....	120
7. Apoio financeiro.....	120
8. Referências bibliográficas .....	121
Anexo I – Carta de aprovação da comissão no uso de animais do capítulo I.....	145
Anexo II – Carta de aprovação da comissão no uso de animais do capítulo II.....	146



## **Lista de abreviaturas**

AGE - produtos finais de glicação avançada

AMPK - proteína quinase ativada por AMP

APP - proteína precursora beta-amiloide

ATP - adenosina trifosfato

BACE1 -  $\beta$ -secretase 1

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro

BHE - barreira hematoencefálica

CAT - catalase

COX-2 - ciclooxigenase 2

CDK5 - cinase dependente de ciclina

DA - doença de Alzheimer

DM - diabetes mellitus

ENF - emaranhados neurofibrilares

FC - fluorocitrato

GFAP - proteína glial fibrilar ácida

GLP-1 - peptídeo semelhante a glucagon 1

GLT1 - transportador de glutamato tipo 1

GLUT - transportadores de glicose

GPx - glutationala peroxidase

GS - glutamina sintetase

GSH - glutationala reduzida

GSSG - glutationala oxidada

GSK-3 - glicogênio sintase cinase-3

Iba-1 - molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizada 1

ICV - intracerebroventricular

IDE - enzima degradadora de insulina

IL - interleucina

iNOS - óxido nítrico sintase induzível

IP - intraperitoneal

IRS1 - substrato 1 do receptor de insulina

LDH - lactato desidrogenase extracelular

LCR - líquido cefalorraquidiano

LPS - lipopolissacarídeo

LRP1 - proteína 1 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade

MAPK - proteína cinase ativada por mitógeno

MCT1 - transportadores de monocarboxilato 1

MG - metilglioxal

NEP - neprilisina

NFκB - fator nuclear kappa B

NGF - fator de crescimento nervoso

NMDA - N-metil-d-aspartato

Nrf2 - fator nuclear E2 relacionado ao fator 2

PGC-1α - coativador gama 1-alfa do receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma

PPARγ - receptores gama ativados por proliferador de peroxissoma

PKA - proteína cinase A

PKB - proteína cinase B

RAGE - receptor para produtos finais de glicação avançada

RO - reconhecimento de objetos

SNC - sistema nervoso central

SOD - superóxido dismutase

STZ - estreptozotocina

TLR4 - receptores do tipo toll 4

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa

VN - vermelho neutro

## **1. Introdução**

### **1.1. Doenças Neurodegenerativas**

O declínio progressivo e irreversível de funções do sistema nervoso central (SNC) é um processo que caracteriza várias doenças, conhecidas como doenças neurodegenerativas. Estas condições são caracterizadas por uma ampla gama de sintomas, incluindo comprometimento cognitivo, distúrbios motores, alterações comportamentais e outras disfunções neurológicas. Entre as doenças neurodegenerativas mais conhecidas estão a doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e doença de Huntington (Lampthey et al., 2022).

As causas das doenças neurodegenerativas são complexas e multifatoriais, envolvendo fatores genéticos e ambientais que podem influenciar a progressão dessas condições. No entanto, o principal fator de risco para essas doenças é o envelhecimento (Hou et al., 2019). Isso porque, com o passar dos anos, diversos processos homeostáticos sofrem prejuízos, podendo levar à inflamação crônica, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, alterações no metabolismo energético e acúmulo de proteínas anormais (Tony Wyss, 2016; Wilson et al., 2023).

### **1.2. Doença de Alzheimer**

Em 1906 Alois Alzheimer fez o primeiro diagnóstico da DA, baseado em sintomas de um paciente que apresentava disfunção cognitiva e perda de memória. Essas manifestações foram associadas à observação de depósitos de placas senis e emaranhados neurofibrilares (ENF) durante a autópsia cerebral (Hippius & Neundörfer, 2003). Desde então, inúmeros estudos foram conduzidos para entender os mecanismos envolvidos desde as fases iniciais da doença, levando ao desenvolvimento dessas alterações mais características.

A DA é a doença neurodegenerativa que atinge o maior número de pessoas no mundo. Estima-se que atualmente mais de 50 milhões de pessoas tenham o diagnóstico desta doença, e este número tende a aumentar com o aumento da expectativa de vida da população, (Gauthier S, Webster C, Servaes S, Morais JA, 2022; Long & Holtzman, 2019). O Brasil possui uma das maiores taxas de prevalência global da doença (Nichols et al., 2019). Dessa forma, faz-se necessário maiores estudos sobre o desenvolvimento da DA na busca de tratamentos mais eficazes.

A DA pode se apresentar de duas formas, familiar ou esporádica. A DA familiar, também chamada de DA precoce, está associada a fatores genéticos e é a forma menos comum da doença, correspondendo a cerca de 5% de todos os casos. Essa forma da doença atinge principalmente indivíduos mais jovens, entre 30 e 50 anos de idade. Devido ao seu fator genético, pode ser identificada pela presença de mutações nos genes da proteína precursora beta-amiloide (APP) e presenilinas 1 e 2, em combinação com a avaliação clínica (Andrade-Guerrero et al., 2023). A forma mais comum da DA é a esporádica, também chamada de DA de início tardio, devido à prevalência em indivíduos de idade acima de 65 anos. Esta forma da doença pode ter seu desenvolvimento influenciado por uma combinação de fatores genéticos, ambientais e de estilo de vida (Zetterberg & Mattsson, 2014).

A DA é principalmente caracterizada pelo comprometimento cognitivo progressivo e perda de memória, características que ainda hoje são cruciais para o seu diagnóstico (Soria Lopez et al., 2019). Esses sintomas clínicos têm sido associados à presença de placas senis, formadas pelo acúmulo de peptídeo beta amiloide ( $\beta$ A), e pela formação de ENF, resultantes da hiperfosforilação da proteína tau (Masters et al., 2015b). Inicialmente as principais áreas cerebrais afetadas são o hipocampo, essencial para a formação da memória e o córtex entorrinal,

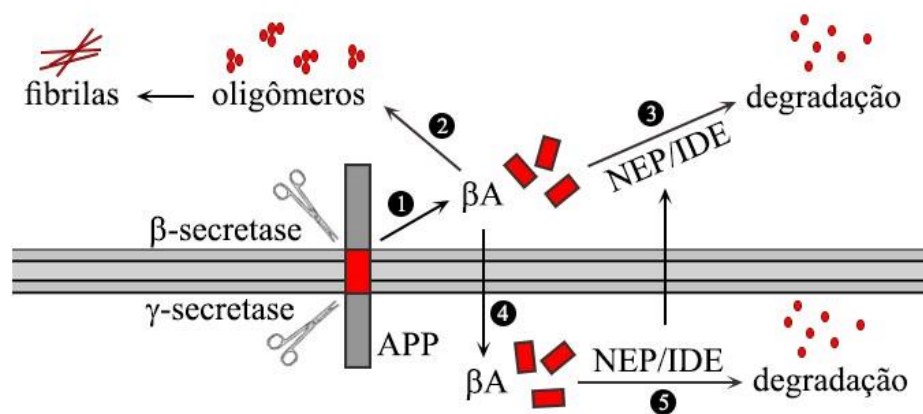
entretanto com a progressão da doença o cérebro pode ser atingido de forma generalizada (Rao et al., 2022).

Muitas hipóteses foram propostas para explicar as causas subjacentes à progressão da DA, incluindo as hipóteses amiloide, colinérgica, glutamatérgica, oligomérica, metálica e diabética. No entanto, os mecanismos que causam o início do desenvolvimento da doença ainda não foram completamente elucidados (P. P. Liu et al., 2019).

### **1.2.1. Peptídeo $\beta$ -amiloide**

A hipótese amiloide é uma das mais estudadas e propõe que o acúmulo de peptídeo  $\beta$ A é uma das alterações centrais na DA, levando a uma cascata de eventos que culminam com a demência (Hardy & Allsop, 1991; Masters et al., 2015b). O peptídeo  $\beta$ A é formado a partir de uma proteína transmembrana altamente expressa em células do SNC, a proteína precursora amiloide (APP). As funções fisiológicas da APP ainda não são completamente entendidas, mas já foi mostrado que ela é importante para os processos de regulação do crescimento neuronal, adesão celular e transporte de membrana (Hefter et al., 2020; Müller et al., 2017).

O processamento da APP ocorre por clivagens proteolíticas sequenciais pelas enzimas  $\alpha$ - ou  $\beta$ -secretase 1 (BACE1) e consecutivamente pela  $\gamma$ -secretase (Figura 1). A clivagem pela  $\alpha$ -secretase inicia a via não amiloidogênica da APP, resultando na produção do fragmento solúvel APP $\alpha$  secretado extracelularmente e do domínio intracelular da APP, enquanto que a via amiloidogênica se dá pela clivagem inicial da  $\beta$ -secretase (Hoe et al., 2012). Na via amiloidogênica, a  $\gamma$ -secretase cliva a APP em diferentes locais da sequência de aminoácidos, resultando em peptídeos  $\beta$ A de diferentes comprimentos, sendo os mais comuns o  $\beta$ A<sub>1-40</sub> e o  $\beta$ A<sub>1-42</sub> (Vassar et al., 2014). Recentemente, ainda foram descritas vias alternativas, não amiloidogênicas, de processamento da APP envolvendo as enzimas  $\eta$ -secretase,  $\delta$ -secretase e meprina (Willem et al., 2015).



**Figura 1. Processamento amiloide.** A APP é clivada pela  $\beta$ -secretase, seguida pela  $\gamma$ -secretase (1), liberando o peptídeo  $\beta$ A para o meio extracelular, onde pode se agregar em oligômeros e fibrilas (2) ou ser eliminado por enzimas degradadoras, como neprilissina (NEP) e a enzima degradadora de insulina (IDE) (3). Parte dos peptídeos  $\beta$ A podem ser internalizados pelas células (4), onde podem sofrer a ação das enzimas de degradação (5).

Os peptídeos  $\beta$ A são inicialmente liberados no meio extracelular como monômeros e têm a capacidade de se agregar em diferentes conjuntos. A forma oligomérica é formada pela complexação de quantidades variáveis de moléculas de  $\beta$ A, e devido à sua solubilidade em água, apresenta alta capacidade de distribuição pelo cérebro e interação com diversas moléculas, membranas, receptores e transportadores das células neurais, contribuindo assim para sua toxicidade. Por outro lado, as formas insolúveis do  $\beta$ A, são caracterizadas por estruturas alongadas e rígidas, chamadas de fibrilas, que são formadas por ligações peptídicas organizadas em estrutura de folhas beta, onde as moléculas de  $\beta$ A se alinham lateralmente. Essas fibrilas já foram consideradas uma das principais causas da neurotoxicidade e da demência, pois se depositam formando as placas amiloides (G. F. Chen et al., 2017). No entanto, a observação de que não há uma correlação direta entre placas amiloides e a gravidade dos sintomas têm evidenciado algumas falhas nessa hipótese (Gomez-Isla, 1997; Kametani & Hasegawa, 2018).

Contudo, assim como os mecanismos de produção de  $\beta$ A ocorrem fisiologicamente, existem também mecanismos responsáveis por manter baixos níveis de  $\beta$ A no cérebro. Dessa forma, o acúmulo de beta amiloide ocorre quando há um desequilíbrio entre os mecanismos de produção e de depuração de  $\beta$ A. Os processos responsáveis por regular os níveis de  $\beta$ A no SNC

incluem mecanismos de degradação enzimática, depuração mediada por células e transporte ativo para fora do cérebro (R. Ullah & Lee, 2023).

A via enzimática desempenha um papel crucial na degradação e eliminação de  $\beta$ A do cérebro. Proteases como a neprilisina (NEP) e a enzima degradadora de insulina (IDE) são fundamentais nesse processo, clivando os peptídeos  $\beta$ A em fragmentos menores, de menor toxicidade e de mais fácil remoção do cérebro (Miners et al., 2011; Wyss-Coray et al., 2003). Tanto a NEP quanto a IDE são capazes de clivar formas monoméricas e oligoméricas de  $\beta$ A (Kato et al., 2022). Estudos mostraram que alterações na expressão e atividade dessas enzimas têm efeitos diretos no acúmulo de  $\beta$ A em modelos *in vivo* e *in vitro* (Behl et al., 2009; Farris et al., 2003; Hellström-Lindahl et al., 2008; Iwata et al., 2001; Miller et al., 2003; Poirier et al., 2006; Sahoo et al., 2021; Yamamoto et al., 2018, 2020). Além disso, algumas evidências podem apoiar um possível efeito colaborativo entre NEP e IDE na regulação dos níveis de  $\beta$ A, uma vez que foi demonstrado que NEP pode metabolizar fragmentos peptídicos do  $\beta$ A gerados pela IDE (Kato et al., 2022).

### **1.2.2. Proteína tau**

A proteína tau é um componente chave na DA, que em condições patológicas pode assumir formas anormais que tendem a se depositar e formar os ENF. A tau é uma fosfoproteína predominantemente neuronal, importante para a montagem e formação dos microtúbulos do citoesqueleto dessas células, contribuindo para o transporte através dos axônios (Yipeng Wang & Mandelkow, 2016)

A função da tau é modulada por diferentes modificações pós-traducionais, dentre elas, a adição de grupos fosfato. Existem até 85 sítios potenciais de fosforilação na sua isoforma mais longa e essa modificação pode variar de acordo com o estágio do desenvolvimento, sendo a tau fetal mais modificada que a tau adulta (Alonso et al., 2018). A fosforilação dessa proteína é crucial para o desempenho de suas funções fisiológicas, podendo aumentar ou diminuir a sua



afinidade pelos microtúbulos, dependendo do sítio de fosforilação, além de poder participar da regulação da plasticidade sináptica e da sinalização intracelular (Yipeng Wang & Mandelkow, 2016). Diferentes cinases podem realizar essas reações, como a glicogênio sintase cinase-3 beta (GSK-3 $\beta$ ), a proteína cinase A (PKA), a proteína cinase B (PKB), a proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) e a cinase dependente de ciclina 5 (CDK5), levando a diferentes efeitos funcionais (Medeiros et al., 2011).

Um aumento desregulado da fosforilação da tau pode levar a perda de suas funções fisiológicas, bem como favorecer a sua agregação, alterações características das chamadas “taupatias”, sendo a mais comum delas a DA (Alonso et al., 2018). Os mecanismos que levam a desregulação da fosforilação dessa proteína ainda não são completamente compreendidos (Masters et al., 2015b). Entretanto, vários fatores podem contribuir para hiperfosforilação anormal da tau, incluindo desequilíbrios na atividade de cinases e fosfatases, inflamação, disfunção mitocondrial e acúmulo de proteínas como  $\beta$ A (Medeiros et al., 2011).

### **1.2.3. Modelo de DA esporádica induzido por estreptozotocina (STZ)**

Existem diversos modelos animais que podem ser empregados no estudo DA, principalmente modelos transgênicos ou induzidos quimicamente. Um dos modelos mais utilizados para estudar a DA esporádica é através da injeção intracerebroventricular (ICV) de STZ (Akhtar et al., 2022). A STZ é um composto derivado da bactéria *Streptomyces achromogenes*, que é tóxico para as células beta pancreáticas produtoras de insulina, e por isso amplamente utilizado para indução de modelos animais de diabetes por injeção via intraperitoneal (IP) (Grieb, 2016). Quando administrada via ICV, a STZ induz o desenvolvimento de fatores de risco e alterações patológicas características da DA, como prejuízo no metabolismo energético, estresse oxidativo, hiperfosforilação da proteína tau, deposição de  $\beta$ A e déficit de memória (Pradip Kumar Kamat, 2015; Letícia Rodrigues et al.,

2009). As alterações causadas no SNC pela STZ ocorrem progressivamente ao longo do tempo após a indução do modelo, o que torna este modelo interessante na investigação dos diferentes estágios de desenvolvimento da DA.

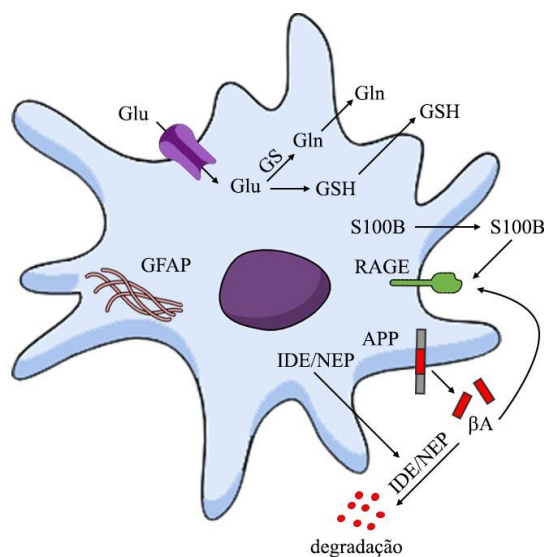
Apesar da STZ já ser extensamente estudada em modelos *in vivo*, o conhecimento sobre seus efeitos diretos em diferentes tipos celulares do SNC ainda é limitado. Alguns trabalhos investigaram seus efeitos sobre neurônios (Bagaméry et al., 2020; Genrikhs et al., 2017; Isaev et al., 2018; Plaschke & Kopitz, 2015), mas poucos sobre astrócitos (Biswas et al., 2017; Rajasekar et al., 2017). No entanto, evidências sugerem que a reatividade glial é um dos principais fatores envolvidos no comprometimento da memória induzida pela STZ em ratos (S. Rai et al., 2014), destacando a relevância do estudo desse composto nos astrócitos como uma ferramenta importante para elucidar os mecanismos pelos quais esse composto causa alterações características da DA

### **1.3. Astrócitos na DA**

O SNC é formado por células neuronais e gliais. Por muitos anos, as células gliais foram coadjuvantes na pesquisa científica, sendo consideradas responsáveis apenas por fornecer suporte estrutural aos neurônios. No entanto, atualmente, compreende-se que as células gliais, incluindo a microglia, os astrócitos e os oligodendrocitos, desempenham papéis fundamentais em várias funções cerebrais (Chung et al., 2015). Os astrócitos, em particular, são reconhecidos por sua importância na regulação da homeostase cerebral (WANG & BORDEY, 2008). Evidências crescentes sugerem que essas células desempenham um papel ativo em várias doenças neurodegenerativas, incluindo a DA (Brandebura et al., 2023). Além disso, astrócitos disfuncionais ou reativos podem contribuir para a progressão da neurodegeneração, através da liberação de mediadores inflamatórios, neurotoxinas e outras moléculas tóxicas (Escartin et al., 2021; Sofroniew & Vinters, 2010).

Os astrócitos se destacam entre as células gliais pela sua abundância e heterogeneidade morfológica. Existem três principais variações morfológicas dessas células: os mais comuns, apresentam processos densos e curtos, são os protoplasmáticos; os com menos processos e que se assemelham a fibras, são os fibrosos; e por fim, os que possuem uma forma mais alongada e com ainda menos processos, que compreendem as células de Bergmann e as células de Müller. Essa variedade na morfologia dos astrócitos reflete a complexidade das funções que desempenham no sistema nervoso central (WANG & BORDEY, 2008).

Dentre as diversas funções dos astrócitos se destacam a modulação da resposta inflamatória, o metabolismo do glutamato, o controle do estresse oxidativo e a regulação da homeostase energética (WANG & BORDEY, 2008). Durante a inflamação, os astrócitos ativados, produzem e secretam citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Leng & Edison, 2021). Os astrócitos também são fundamentais no metabolismo de glutamato (Figura 2), prevenindo o acúmulo desse neurotransmissor, através da sua captação da fenda sináptica para conversão em glutamina pela enzima glutamina sintetase (GS), no ciclo glutamato-glutamina, ou em glutathiona reduzida (GSH) (Sood et al., 2021). A GSH, um tripeptídeo com uma importante ação antioxidante que atua diretamente na remoção de espécies reativas de oxigênio, convertendo-se em glutathiona oxidada (GSSG) (Y. Chen et al., 2020). Além disso, no metabolismo energético cerebral, os astrócitos se destacam por captar glicose, através do transportador de glicose do tipo (GLUT1), que são altamente expressos nessas células e convertida a lactato pela via glicolítica. O lactato pode ser entregue aos neurônios vizinhos para uso energético, mas também é responsável por desempenhar outras funções, como participar no mecanismo da formação da memória e modulação da plasticidade sináptica (Beard et al., 2022; Gonçalves et al., 2018).



**Figura 2. Funções dos astrócitos.** A imagem representa as principais proteínas e funções astrocíticas, como a remoção do glutamato da fenda sináptica e a síntese de Gln e GSH, metabolismo amiloide e as proteínas S100B, RAGE e GFAP.

A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) é uma proteína de filamento intermediário característica de astrócitos maduros no SNC, sendo uma das principais proteínas estruturais dessas células. Essa proteína desempenha um papel fundamental na manutenção da integridade estrutural astrocítica, bem como na formação da cicatriz glial (Sofroniew & Vinters, 2010). Alterações no imunoconteúdo dessa proteína estão associados a reatividade astrocíticas, condição associada a respostas, tanto fisiológicas quanto patológicas, dessas células (Escartin et al., 2021).

Outra proteína característica dos astrócitos é a S100B, uma proteína pertencente à família de proteínas S100 ligantes de cálcio. No SNC, a S100B é produzida e secretada por astrócitos e tem uma grande variedade de funções tanto no interior dessas células, sendo importante para mecanismos de proliferação e migração celular, como também pode atuar extracelularmente, sendo parte desses efeitos mediados pela ligação ao receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE), que também tem como ligante o peptídeo βA. Entretanto, altas concentrações dessa proteína podem ser associadas a efeitos tóxicos, sendo considerada uma

marcadora de dano cerebral, muito associada a neurodegeneração (Donato, 2001; Gonçalves et al., 2008).

Ambas as proteínas, GFAP e S100B, são importantes marcadores de astrócitos e amplamente avaliadas em estudos de disfunções dessas células (Sofroniew & Vinters, 2010) e no contexto das doença neurodegenerativas (Donato, 2001; Escartin et al., 2021; Rodríguez et al., 2024). Em pacientes com DA, foi observado que astrócitos na forma reativa circundam as placas amiloides, apresentando uma expressão aumentada de GFAP e S100B (Birch, 2014; Escartin et al., 2021; K. Li et al., 2019).

A estreita relação entre os astrócitos e a DA também é evidenciada pela grande expressão astrogial do gene da apolipoproteína E4, um dos principais fatores de risco genético na DA. Além disso, os astrócitos podem contribuir para a carga amiloide cerebral, uma vez que expressam BACE1 e APP. De fato, já foi mostrado que, mesmo produzindo pouca quantidade de  $\beta$ A em comparação com neurônios, devido a sua abundância no SNC, a produção de  $\beta$ A pelos astrócitos se faz relevante na progressão da DA (Frost & Li, 2017). Entretanto, os astrócitos também podem exercer um importante papel protetor na DA através do protagonismo, juntamente com a microglia, em mecanismos de depuração e eliminação de  $\beta$ A do SNC (Ries & Sastre, 2016; Wyss-Coray et al., 2003). Além de expressar proteases degradadoras de  $\beta$ A, como NEP e IDE (Figura 2), os astrócitos atuam na depuração amiloide através de mecanismos de degradação proteassomal, autofagia e chaperonas extracelulares (Davis et al., 2021a; Ries & Sastre, 2016; Xin et al., 2018). Outra via importante de eliminação de  $\beta$ A é seu transporte do cérebro para a periferia, principalmente através da barreira hematoencefálica (BHE). Esse mecanismo requer transportadores específicos, como a proteína 1 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP1), além do transporte via canais de água como a aquaporina 4 presentes nos pés astrocíticos (Xin et al., 2018).

#### **1.4. Fases iniciais da DA**

Tem sido proposto que nas fases iniciais do desenvolvimento da DA há uma resposta inicial dos astrócitos, uma vez que essas células desempenham papéis cruciais em diversos fatores associados ao início e progressão da doença (Brandebura et al., 2023; De Strooper & Karran, 2016; Schultz et al., 2021). Portanto, uma compreensão mais aprofundada desses mecanismos nos astrócitos pode ser um ponto chave para o entendimento do início da doença, contribuindo na busca de diagnósticos mais precoces, além da identificação de alvos terapêuticos potenciais nestes estágios, abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes.

Alterações como neuroinflamação, estresse oxidativo, prejuízo na sinalização de insulina, diminuição do metabolismo energético cerebral e alteração no metabolismo lipídico já foram associadas ao início da DA, precedendo o aparecimento das placas amiloides e dos ENF (Anand et al., 2014; Heneka et al., 2015; Passeri et al., 2022). Dessa forma, o diagnóstico precoce da DA permanece desafiador, devido a sua característica complexa e multifatorial. As alterações iniciais são inespecíficas e podem estar associadas a outras doenças neurodegenerativas ou ao processo de envelhecimento (Hou et al., 2019). Além disso, a complexidade da DA também se deve à diversidade de alterações encontradas entre pacientes, o que sugere a existência de diferentes mecanismos subjacentes ao desenvolvimento da doença (Duara & Barker, 2022; Wilson et al., 2023).

A presença de neuroinflamação está intrinsecamente associada à fisiopatologia das doenças neurodegenerativas (Stephenson et al., 2018). Na DA, já foi mostrado que o acúmulo de  $\beta$ A e a presença de ENF induzem a um aumento da resposta inflamatória no SNC (Ismail et al., 2020). Entretanto, diversas evidências têm sustentado que a neuroinflamação desempenha um papel crucial desde o início da doença (Leng & Edison, 2021). Já foi mostrado em pacientes com comprometimento cognitivo leve que a ativação da resposta inflamatória microglial

precede a formação de placas de amiloides (Hamelin et al., 2016; Okello et al., 2009). Além disso, a necessidade da neuroinflamação para o desenvolvimento da DA foi reforçada em um trabalho com primatas que mostrou que a patologia amiloide só foi induzida por injeção de  $\beta$ A quando coadministrada com um indutor inflamatório, o lipopolissacarídeo (LPS) (Philippens et al., 2016). Adicionalmente, foi mostrado que há uma correlação entre a mutação em genes relacionados à resposta imune e o risco aumentado para DA (Boyd et al., 2022; Sobue et al., 2023).

Muitos estudos utilizam a toxina derivada da parede celular de bactérias gram-negativas LPS para indução de modelos inflamatórios, incluindo estudos de doenças neurodegenerativas (Dourado et al., 2020; Goshi et al., 2020; Oliveira-Junior et al., 2019). A resposta inflamatória ao LPS ocorre após sua ligação em receptores do tipo toll 4 (TLR4), expressos por células gliais, levando a ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF $\kappa$ B), que por sua vez desencadeia a liberação de várias citocinas pró-inflamatórias necessárias para ativar respostas imunes inatas (S. Singh et al., 2022). A administração ICV do LPS em modelos animais é capaz de promover danos cognitivos, aumentar a atividade da via amiloidogênica de processamento da APP, bem como aumentar os níveis de fosforilação da tau (Da Ré et al., 2020; J. W. Lee et al., 2008; L.-M. Wang et al., 2018).

Outra alteração que parece determinante para o desenvolvimento das doenças neurodegenerativas é o prejuízo do metabolismo energético cerebral (Gonçalves et al., 2018). A glicose é o substrato energético mais utilizado pelo cérebro em indivíduos adultos e o hipometabolismo de glicose no SNC na DA tem sido relacionado a problemas na captação de glicose pelas células ou mesmo a distúrbios metabólicos intracelulares (Mosconi et al., 2008; Raut et al., 2023).

O fluorocitrato (FC) é um composto capaz de induzir a diminuição do metabolismo energético celular, sendo utilizado como um inibidor de astrócitos por ter especificidade por

essas células (Rezagholizadeh et al., 2022). Esse composto entra nas células através dos transportadores de monocarboxilato 1 (MCT1) (Rae et al., 2012) e atua inibindo a enzima aconitase, do ciclo do ácido cítrico, e conseqüentemente, diminuindo a produção de adenosina trifosfato (ATP) (Hassel et al., 1995). O uso do FC em animais evidencia a importância dos astrócitos na progressão do dano cognitivo, uma vez que ao inibir a reatividade astrocítica pode ser observada uma melhora do dano cognitivo em modelos de dano cerebral (H. Y. Zhang et al., 2020; X. Zhang et al., 2019).

Uma das principais doenças associadas a disfunção do metabolismo de glicose, o diabetes mellitus (DM), é um dos um dos fatores que predisõem o desenvolvimento da DA. A DM pode levar a um acúmulo de glicose no SNC, causando resistência à insulina, e essa desregulação da sinalização de insulina tem sido associada a complicações da DM como o comprometimento cognitivo (Jash et al., 2020). As altas concentrações de glicose favorecem as reações de glicação, durante as quais são formados como produtos compostos dicarbonil, como o metilglioxal (MG), capaz de realizar a glicação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, e formar produtos finais de glicação avançada (AGEs) (Gonçalves et al., 2018). Os AGEs formados durante essas reações podem se ligar aos receptores RAGE (Allaman et al., 2015), que também ligam S100B (Hofmann et al., 1999) e peptídeo  $\beta$ A (Shi et al., 2009), reforçando a influência desses compostos na DA.

O MG é amplamente utilizado em estudos *in vivo* e *in vitro* na investigação dos efeitos das reações de glicação no cérebro (F. Hansen et al., 2017; F. Hansen, Battú, et al., 2016; Lissner et al., 2021, 2022). Seus efeitos na propagação de doenças neurodegenerativas, em especial da DA, já foram extensivamente mostrados através da promoção da hiperfosforilação da tau (X. H. Li et al., 2012), aumento do acúmulo amiloide (Patil et al., 2020), glicação de  $\beta$ A (Angeloni et al., 2014), além de levar ao comprometimento cognitivo (Lissner et al., 2021).



## 1.5. Terapias

A complexidade, os múltiplos fatores e o tempo de progressão da DA, torna desafiador o tratamento eficaz dessa doença. As terapias atualmente aprovadas para o tratamento da DA têm seus mecanismos de ação baseados em alvos tardios da doença, promovendo apenas alívio sintomático, sem retardar sua progressão (Anand et al., 2014; Islam et al., 2015; Baljinder Singh et al., 2024). Os fármacos da classe dos inibidores da acetilcolinesterase donepezina, rivastigmina e galantamina proporcionam uma maior disponibilidade de acetilcolina, um neurotransmissor importante para memória e função cognitiva. Outra alternativa de tratamento aprovada para a DA são os antagonistas N-metil-d-aspartato (NMDA), como a memantina, que bloqueia a superativação desses receptores. Além disso, mais recentemente, a imunoterapia com os anticorpos monoclonais aducanumabe e lecanemab, que atuam sobre agregados de  $\beta$ A, foi aprovada (Gu et al., 2023; Baljinder Singh et al., 2024). Dessa forma, é de extrema relevância a busca por novos alvos terapêuticos capazes de levar à cura ou impedir a progressão da DA.

Considerando que a DA é uma doença multifatorial e que tem seu desenvolvimento iniciado há bastante tempo antes do aparecimento dos sintomas clínicos, parece interessante se pensar em estratégias terapêuticas que atuem também sobre múltiplos alvos (Piemontese, 2017). Dentre as estratégias usadas no desenvolvimento de novas terapias, as moléculas de origem natural costumam ocupar um importante espaço nos estudos tanto como suplementação, como inspiração para o desenvolvimento de novos fármacos, ou ainda como ponto de partida para preparação de moléculas semissintéticas (Sharifi-Rad et al., 2020). Na busca de novas estratégias terapêuticas que atuem em fases mais precoces da DA alguns compostos bioativos vêm mostrando ações promissoras, entre eles os polifenóis, como a curcumina, o resveratrol e a epigallocatequina galato, que atuam na proteção de diversos mecanismos envolvidos na neurodegeneração (Di Meo et al., 2020).

## 1.6. Curcumina

A curcumina é um composto polifenólico encontrado na *Curcuma longa*, popularmente chamada de "açafrão-da-terra", uma planta rizomatosa herbácea perene pertencente à família *Zingiberaceae*. Nativa do sudeste da Ásia, especialmente da Índia, onde é amplamente cultivada e utilizada tanto na culinária como na medicina tradicional, esta especiaria é conhecida por sua intensa coloração amarelo-alaranjada e seu sabor terroso e ligeiramente amargo. A curcumina, que é seu principal componente ativo, apresenta ação em múltiplos alvos moleculares, conferindo-lhe uma grande variedade de efeitos, incluindo atividade antioxidante, anti-inflamatória, neuroprotetora, antimicrobiana e anticancerígena, e por isso têm despertado interesse científico (Benameur et al., 2022; Priyadarsini, 2014). Um dos efeitos da curcumina que se destaca é no potencial de prevenção e tratamento da DA (M. Chen et al., 2018; Perales-Salinas et al., 2024).

### 1.6.1. Características físico-químicas da curcumina

A nomenclatura química da curcumina segundo a IUPAC é 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona ou diferuloilmetano. Apresentando a fórmula química  $C_{21}H_{20}O_6$  e um peso molecular de 368,38 g/mol, sua estrutura química é composta por dois anéis fenólicos unidos por uma cadeia de sete carbonos. Essa configuração forma uma estrutura em equilíbrio ceto-enol, mantida pela transferência de átomos de hidrogênio intramoleculares (Nantasenamat et al., 2014; Racz et al., 2022). Em ambientes ácidos (pH 3–7), a curcumina assume uma forma cetônica, enquanto em ambientes alcalinos (pH > 8), prevalece a forma enólica. A forma enólica exerce uma função doadora de elétrons e é, pelo menos em parte, responsável pela capacidade da curcumina em neutralizar os radicais livres (Rege et al., 2019).

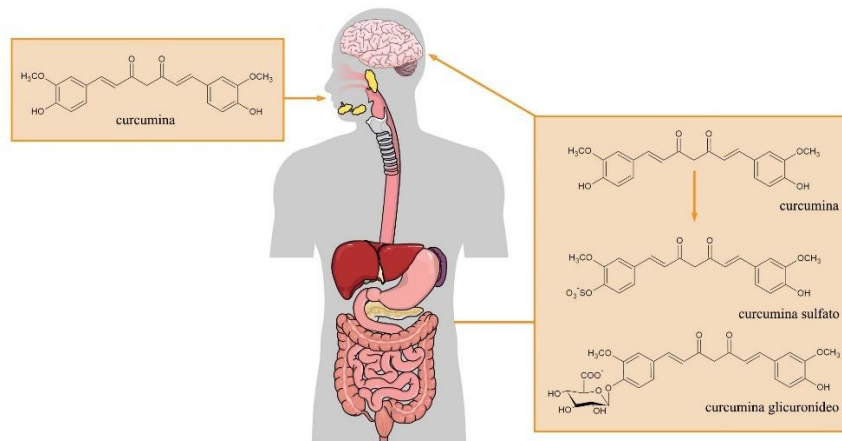
A estabilidade da curcumina pode variar dependendo do pH, apesar de apresentar uma degradação lenta em meio ácido. Entretanto, em condições básicas, degrada-se rapidamente

formando compostos como ácido ferúlico e vanilina, além de também apresentar sensibilidade à luz (Racz et al., 2022).

Outra característica relevante da curcumina é a sua natureza lipofílica, que permite que ela atravesse a BHE e exerça efeitos intracelulares, essa característica é importante também para a ligação da curcumina em placas amiloides, conferindo a ela um dos seus importantes efeitos protetores na DA (Nantasenamat et al., 2014; Sorrenti et al., 2018).

### **1.6.2. Farmacocinética da curcumina**

Estudos sobre a absorção, distribuição, metabolismo e excreção da curcumina em roedores indicam que ela sofre um metabolismo rápido e eficiente, mas que prejudica a sua biodisponibilidade (Benameur et al., 2022; R. A. Sharma et al., 2007). É sugerida uma baixa absorção oral para a curcumina devido a sua baixa solubilidade em água (Nantasenamat et al., 2014) enquanto a maior parte é excretada nas fezes (Wahlstrom & Blennow, 1978). Em camundongos tratados com 1 g/kg de curcumina, a concentração plasmática máxima foi observada após 1 hora (Pan et al., 1999), enquanto em indivíduos adultos que ingeriram 8 gramas de curcumina por via oral, essa concentração foi alcançada entre 1 e 2 horas (Ruffin IV et al., 2003). Após a absorção, a curcumina é distribuída em vários tecidos, incluindo sangue, fígado, rins e intestino, atravessando membranas celulares e a barreira hematoencefálica devido à sua natureza lipofílica (Priyadarsini, 2014). No fígado e intestino, ela sofre biotransformação (Figura 3), principalmente por reações de redução e conjugação, formando metabólitos como sulfato de curcumina e curcumina glucuronídeo, consideradas menos bioativas que a forma livre (Ireson et al., 2002; Perales-Salinas et al., 2024).



**Figura 3. Metabolismo da curcumina.** A curcumina administrada oralmente sofre biotransformação no fígado e intestino, gerando metabólitos como curcumina sulfato e curcumina glicuronídeo. A curcumina e seus metabólitos são distribuídos através da circulação sanguínea, podendo atravessar a BHE e alcançar o cérebro.

Estudos de toxicidade da curcumina não encontraram toxicidade limitante de dose, sugerindo que essa molécula é segura mesmo em doses elevadas (Nantasenamat et al., 2014). Na Índia o consumo médio de curcumina, baseado no consumo de cúrcuma na culinária, é em média de 60 a 100 mg por dia (Shah et al., 1999). Em ensaios clínicos foram utilizadas doses orais diárias entre 3,6 a 12 mg, tendo sido relatados efeitos adversos como dor de cabeça, diarreia e erupção cutânea, mas que não foram diretamente relacionados à dose (Cheng et al., 2001; Lao et al., 2006; Sharma et al., 2004).

As principais limitações do uso da curcumina são baixa solubilidade em água, baixa absorção, rápida eliminação, degradação em pH alcalino e biodisponibilidade oral limitada (Priyadarsini, 2014; Racz et al., 2022). Baseado nisso, muitos estudos têm buscado novas estratégias para superar esses problemas inerentes a curcumina, incluindo formulação de nanopartículas e micelas, complexação com ciclodextrinas, incorporação em lipossomas, conjugação com polímeros, uso de adjuvantes como piperina, com capacidade de melhorar a absorção e biodisponibilidade da curcumina, ou ainda incorporação da curcumina em sistemas de liberação controlada, como hidrogéis e microesferas (Racz et al., 2022; Li Zhang et al., 2020).

### 1.6.3. Curcumina na DA

A curcumina, com sua estrutura molecular multifuncional, tem o potencial de desempenhar um papel significativo na pesquisa e terapia da DA. Além de atravessar a BHE e se ligar especificamente a agregados de  $\beta$ A e proteínas tau anormais, a curcumina demonstrou capacidade de inibir a agregação de  $\beta$ A, auxiliar na eliminação de depósitos existentes e até mesmo prevenir a formação de novos depósitos (M. Chen et al., 2018; Tang et al., 2017).

A prevenção da DA é uma estratégia crucial, uma vez que não há cura para a doença atualmente. É sugerido que alimentação balanceada, exercícios físicos e atividades intelectuais podem favorecer a saúde do cérebro, em particular, dietas com compostos fenólicos têm recebido destaque (Yamada et al., 2015). Alguns estudos mostraram que a suplementação com curcumina em animais e humanos pode levar a melhorias na função cognitiva, manutenção da função mitocondrial e sináptica, redução da inflamação e atraso da neurodegeneração, reduzindo assim o risco de DA (Ray et al., 2011; Reddy et al., 2018; Ringman et al., 2012).

A curcumina também é extensamente estudada pelo seu potencial no tratamento da DA. A curcumina exerce múltiplos efeitos sobre o  $\beta$ A, podendo atuar nas etapas de formação, agregação e depuração. Na etapa de formação já foi mostrado que a curcumina pode atenuar a maturação da APP, suprimir a expressão de BACE1 (H. Liu et al., 2010), além de inibir a sua atividade (Parr et al., 2015). Na agregação de  $\beta$ A, a ação da curcumina ocorre devido a sua alta afinidade por alguns resíduos do peptídeo, formando fortes interações hidrofóbicas (Kundaikar & Degani, 2015; Reinke & Gestwicki, 2007), podendo bloquear a montagem e formação de fibrilas, além de desestabilizar fibrilas já formadas (Martin et al., 2019; H. Yang et al., 2022). Foi mostrado também que a ação da curcumina como quelante de metais, em especial  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , também auxilia no bloqueio da agregação de  $\beta$ A (Banerjee, 2014; Perrone et al., 2010). Além disso, o tratamento com curcumina em camundongos APP/PS1dE9, modelo transgênico de DA, leva à eliminação ou redução de placas amiloides (Garcia-Alloza et al.,

2007). Por outro lado, a curcumina também acelera a depuração de  $\beta$ A, aumentando a sua fagocitose (Ferreira et al., 2016; Laura Zhang et al., 2006), além de induzir a degradação mediada por enzimas degradadoras de  $\beta$ A (P. T. Chen et al., 2016).

No contexto da fosforilação da tau, a curcumina demonstrou capacidade de inibir a hiperfosforilação e a agregação dessa proteína (Tang et al., 2017), se ligando a regiões específicas e, inibindo a formação de agregados (Rane et al., 2017). A curcumina pode suprimir a fosforilação anormal da tau interagindo diretamente com a GSK-3 $\beta$  (Sun et al., 2017).

Além das ações diretas da curcumina nas alterações específicas da DA, já foi mostrado que seus efeitos podem modular outros aspectos envolvidos na doença. Dentre os efeitos da curcumina que podem contribuir para seus efeitos benéficos observados em estudos da DA, estão sua ação anti-inflamatória, antioxidante, inibição da enzima acetilcolinesterase, melhora na via de sinalização da insulina, capacidade de quelar metais e redução do colesterol (Tang et al., 2017).

#### **1.6.4. Ação via PPAR $\gamma$**

A curcumina atua em diversos alvos moleculares, destacando-se estão os receptores gama ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR $\gamma$ ). Estudos sugerem que a curcumina pode atuar como um agonista do PPAR $\gamma$ , ativando diretamente esses receptores e promovendo efeitos benéficos na resposta inflamatória, função mitocondrial, estresse oxidativo, disfunção metabólica e metabolismo lipídico (Jacob et al., 2007).

Os PPAR são receptores nucleares que atuam na regulação da transcrição gênica, controlando vários processos biológicos. São conhecidos três subtipos de PPARs, o  $\alpha$ , o  $\beta/\delta$  e o  $\gamma$ , que diferem entre si pela sua localização nos tecidos, pela especificidade por ligantes e por suas funções biológicas (Zolezzi et al., 2017). A via do PPAR $\gamma$  tem se destacado no estudo de doenças neurodegenerativas devido a seus efeitos neuroprotetores (d'Angelo et al., 2019;

Zolezzi et al., 2017), em especial na DA, que já foi mostrado em estudos usando agonistas PPAR $\gamma$ , como os medicamentos pioglitazona e rosiglitazona (Agarwal et al., 2017; Khan et al., 2018).

Alguns trabalhos usaram modelos *in vitro* para verificar se o PPAR $\gamma$  é responsável pelos efeitos neuroprotetores da curcumina. Um aumento da expressão de PPAR $\gamma$  foi observado em neurônios (Z. J. Liu et al., 2014), células gliais (Z. J. Liu et al., 2016) e em culturas primárias de astrócitos (H. M. Wang et al., 2010) tratados com curcumina. Além disso, o antagonista PPAR $\gamma$ , PPAR-2-cloro-5-nitrobenzanilida (GW9662), quando administrado juntamente com a curcumina, tanto em modelos *in vivo* como *in vitro* suprimiu seus efeitos protetores, sugerindo que um dos mecanismos de ação da curcumina na DA pode envolver a via do PPAR $\gamma$  (Liu et al., 2014, 2016; Rinwa et al., 2010; H. M. Wang et al., 2010).

## **2. Justificativa**

As doenças neurodegenerativas apresentam alterações comuns entre si, como alterações de metabolismo energético, neuroinflamação e agregação anormal de proteínas. A DA é comumente diagnosticada em seus estágios mais avançados, onde os sintomas já se apresentam de forma grave. Apesar de as características fisiopatológicas e sintomas clínicos da DA já serem extensamente estudados e bem estabelecidos, os mecanismos que levam ao início do desenvolvimento da doença ainda não são completamente entendidos. Entretanto, alguns estudos mostram que os astrócitos apresentam disfunções nos estágios pré-clínicos da doença. Faltam também estratégias terapêuticas que consigam intervir ainda nesses estágios mais precoces. Com isso, faz-se necessário maiores investigações sobre as alterações que ocorrem no cérebro nos estágios iniciais da doença, bem como o estudo de alvos terapêuticos que possam intervir ainda nesta fase. Considerando que a curcumina já se mostrou capaz de atuar em processos envolvidos na fase inicial da DA, como a neuroinflamação e o estresse oxidativo, além de apresentar propriedades anti-amiloidogênicas, o estudo de seu potencial efeito protetor e de seus mecanismos moleculares no SNC nesta patologia se faz necessário.

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar as alterações iniciais da doença de Alzheimer *in vivo* e *in vitro*, bem como o potencial papel preventivo da curcumina.

### **2.2. Objetivos específicos**

- 2.2.1. Avaliar os efeitos de agentes miméticos de alterações encontradas nas fases iniciais da DA sobre funções astrocíticas, bem como no metabolismo amiloide em astrócitos *in vitro*;
- 2.2.2. Avaliar o efeito da administração oral da curcumina nas fases iniciais da DA em um modelo animal da forma esporádica da doença induzido por STZ;
- 2.2.3. Investigar o PPAR $\gamma$  como um possível alvo molecular da curcumina em um modelo *in vitro* de cultura de astrócitos.



### **3. Resultados**

#### **3.1. Capítulo I**

*In Vitro Astroglial Dysfunction Induced by Neurotoxins: Mimicking Astrocytic Metabolic Alterations of Alzheimer's Disease*

Artigo publicado no periódico *Metabolites*

## Article

# In Vitro Astroglial Dysfunction Induced by Neurotoxins: Mimicking Astrocytic Metabolic Alterations of Alzheimer's Disease

Jéssica Taday , Fernanda Telles Fróes, Marina Seady, Carlos Alberto Gonçalves \*  and Marina Concli Leite 

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre 90035-003, Brazil; jessica.taday@ufrgs.br (J.T.); fernanda.froes@ufrgs.br (F.T.F.); pedraseady.marina@mayo.edu (M.S.); marina.leite@ufrgs.br (M.C.L.)

\* Correspondence: casg@ufrgs.br

**Abstract:** Astrocytes play fundamental roles in the maintenance of brain homeostasis. The dysfunction of these cells is widely associated with brain disorders, which are often characterized by variations in the astrocyte protein markers GFAP and S100B, in addition to alterations in some of its metabolic functions. To understand the role of astrocytes in neurodegeneration mechanisms, we induced some of these metabolic alterations, such as energy metabolism, using methylglyoxal (MG) or fluorocitrate (FC); and neuroinflammation, using lipopolysaccharide (LPS) and streptozotocin (STZ), which is used for inducing Alzheimer's disease (AD) in animal models. We showed that MG, LPS, STZ and FC similarly caused astrocyte dysfunction by increasing GFAP and reducing S100B secretion. In the context of AD, STZ caused an amyloid metabolism impairment verified by increases in A $\beta$ 1-40 peptide content and decreases in the amyloid degradation enzymes, IDE and NEP. Our data contribute to the understanding of the role of astrocytes in brain injury mechanisms and suggest that STZ is suitable for use in vitro models for studying the role of astrocytes in AD.

**Keywords:** astrocytes; Alzheimer's disease; streptozotocin; lipopolysaccharide; fluorocitrate; methylglyoxal



**Citation:** Taday, J.; Fróes, F.T.; Seady, M.; Gonçalves, C.A.; Leite, M.C. In Vitro Astroglial Dysfunction Induced by Neurotoxins: Mimicking Astrocytic Metabolic Alterations of Alzheimer's Disease. *Metabolites* **2024**, *14*, 151. <https://doi.org/10.3390/metabo14030151>

Academic Editors: Marta Tomczyk and Magdalena Podlacha

Received: 1 February 2024

Revised: 21 February 2024

Accepted: 27 February 2024

Published: 1 March 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Astrocytes are implicated in most of the studies of brain disorders accompanied by cognitive impairment, mostly associated with neurodegenerative diseases. Some mechanisms of cognitive impairment are related to astrocytic dysfunction [1–3]. Aging, the main risk factor in neurodegenerative diseases [4,5], changes brain metabolism, and studies suggest that cognitive decline can be affected by astroglial metabolism dysfunction [6]. In this sense, considering the accelerated aging of the global population, it is crucial to better understand the role of astrocytes in the neurodegeneration processes.

Astrocytes are glial cells involved in maintaining brain homeostasis and developing synapses and plasticity, contributing to memory consolidation [3,7]. In this sense, it is important to highlight some of their characteristic proteins. S100B is a calcium-binding protein with toxic or trophic functions depending on the context and is considered a marker of brain damage [8]. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is a cytoskeletal protein which is usually associated with the activation of astrocytes [9]. Furthermore, astrocytes play a crucial role in cerebral glutamate metabolism by participating in the glutamate–glutamine cycle, which is related to the cognition process. These cells uptake glutamate from the synaptic cleft and then convert it to glutamine by glutamine synthetase (GS) or use this glutamate to synthesize the endogenous antioxidant glutathione (GSH) [7,10,11]. The disruption of some of these astrocyte functions is associated with the early stages of brain disorders [2,3,12].

Brain degenerative diseases are associated with numerous factors, such as cellular energy metabolism impairment, inflammatory responses and protein aggregation [13]. Many compounds have been used to mimic some of the alterations associated with the initiation or progression of neurodegeneration.

The inhibition of astrocytes by the administration of fluorocitrate (FC), which impairs energy metabolism by the inhibition of aconitase's impact on the citric acid cycle, specifically in astrocytes [14], has been linked to the inhibition of reactive astrocytes [15,16]. FC administration ameliorated cognitive impairment in models of traumatic brain injury [17] and ischemic stroke [15], highlighting the importance of astrocytes in cognitive damage progression. FC enters the astrocyte via monocarboxylate transporter 1 (MCT1); this lactate transporter is also essential for the brain's energy metabolism and is crucial for cognition [18].

Diabetes mellitus (DM), which leads to cognitive impairment, is a risk factor for neurodegenerative diseases [19]. Methylglyoxal (MG) is a reactive dicarbonyl metabolite of glucose, which is produced during DM and is also used to mimic its features in vitro [20–23] and in vivo [24,25]. MG leads to an increase in advanced glycation end products (AGEs), which can interact with and alter the levels and activity of their receptor (RAGE) in the brain. [26]. It should be emphasized that astrocytes express RAGE, which, in addition to AGEs [27], binds S100B [28,29] and amyloid beta ( $A\beta$ ) peptide [30,31].

Furthermore, most neurodegenerative diseases and other cognitive impairment conditions are accompanied by neuroinflammation [32]. Lipopolysaccharide (LPS) is a bacterial toxin widely used to induce an inflammatory response by binding to the TLR4 receptor, expressed by glial cells, including astrocytes [33]. In fact, intracerebroventricular injection of LPS causes memory impairment in rats [34]. The TLR4 and RAGE receptors are reportedly altered in neurodegenerative diseases [35,36].

Cognitive impairment and memory loss are the main symptoms of Alzheimer's disease (AD), the most prevalent neurodegenerative disease, and are frequently related to the presence of characteristic cerebral alterations. Senile plates formed by amyloid beta ( $A\beta$ ) peptide accumulation and neurofibrillary tangles (NFTs) formed by the hyperphosphorylation of tau protein [37] are considered hallmarks of the disease. However, AD is a multifactorial disease, and other biochemical alterations can start years before the appearance of its symptoms and hallmarks [38]. It is important to note that astrocytic alterations are found in the initial stages of Alzheimer's disease [12].

Various animal models are available to study AD characteristics, such as intracerebroventricular streptozotocin administration (ICV-STZ). ICV-STZ is a chemical-induced model of sporadic Alzheimer's disease that has been extensively explored [39–41], but the use of STZ in in vitro models has been little explored, especially in astrocytes [42]. The mechanism by which STZ induces AD is not entirely understood, but it is known that the compound can enter CNS cells via glucose transporter 2 (GLUT2) and interfere with the insulin receptor (IR), compromising the glycogen synthase kinase 3 (GSK3) pathway and affecting the metabolism of  $A\beta$  peptide and tau phosphorylation. However, the capacity of this compound to interact with astroglial cells needs further investigation [43,44]. Having an appropriate model to study the role of astrocytes in AD is interesting because, even though the production of  $A\beta$  by astrocytes is lower than that of neuronal production, considering their high number in the CNS, astrocytic  $A\beta$  production is also significant [12]. In addition, astrocytes play an important role in  $A\beta$  metabolism by sending it to the peripheral tissues or degrading it by enzymatic mechanisms such as via neprilysin (NEP) or insulin-degrading enzyme (IDE). Therefore, astrocytes can play a dual role in AD; they are protective in the early stages and prevent the accumulation of  $A\beta$  peptides; however, upon the progression of the disease, they contribute to the production and accumulation of this peptide [45–47].

Astrocytes play a direct role in the protection from and development of neurodegenerative diseases and can be a key point for understanding neurodegenerative disease development, especially AD. However, it is not clear if astrocytic dysfunction induced by

different stimuli leads to metabolic alterations observed in AD. Therefore, the objective of the present study was to induce some Alzheimer's disease-associated dysfunctions in astrocytes by exposing primary astrocyte cultures to MG, FC, LPS or STZ to evaluate the astrocytes' function and A $\beta$  metabolism. Our results showed that MG, FC, LPS and STZ caused astrocyte dysfunction and suggested that STZ is suitable for use in *in vitro* models for study of the role of astrocytes in some of the metabolic changes involved with AD.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

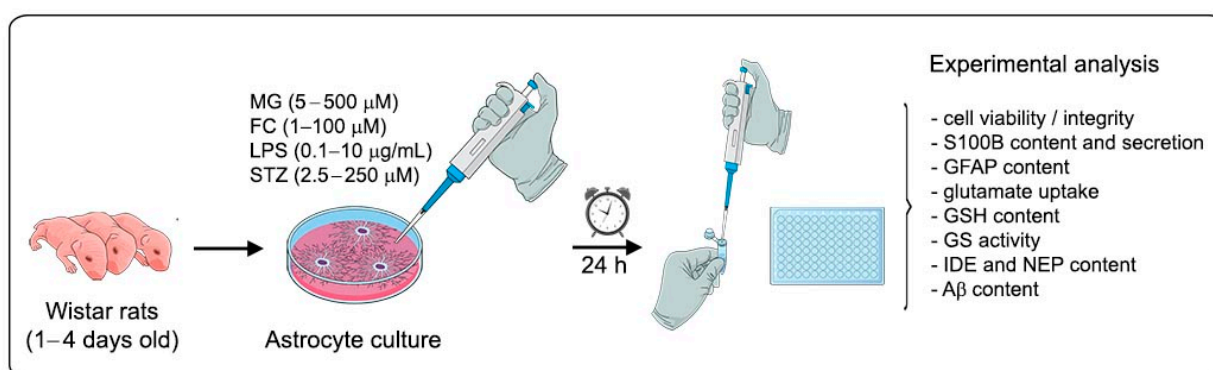
Methylglyoxal (M0252), fluorocitric acid barium salt (F9634), lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 055:B5 (L4005), streptozotocin (S0130), poly-L-lysine (P1274), methyl thiazolyl diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) (M2128), neutral red (N4638), propidium iodide (P4170), bisbenzimidazole H 33258 (14530), amphotericin B solubilized (A9528), HEPES (H7006), sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>) (S5761), glucose (G5400), albumin from chicken egg white (A5253), phenylmethylsulfonyl fluoride (P7626), ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetracetic acid (E4378), dimethyl sulfoxide (D8418), L-glutamic acid  $\gamma$ -monohydroxamate (G2253), anti-S100B antibody (SH-B1) (S2532), S100B protein from bovine brain (S6677), imidazole (I2399), *o*-phenylenediamine (P9029), reduced glutathione (G4251), phthaldialdehyde (P1378) and L-glutamate (G5889) were purchased from Sigma (St. Louis, MI, USA). Fetal calf serum (FCS) (12657-029), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (31600-034), Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) (21600-010) and gentamicin (15710072) were purchased from Gibco (Carlsbad, CA, USA). Cell culture plates were purchased from Falcon (353047 for 24-well, 353043 for 12-well and 353072 for 96-well). Human GFAP (345996) was obtained from Calbiochem. Bovine serum albumin Cohn fraction V (1870) was purchased from Inlab (São Paulo, Brazil). I-[2,3-<sup>3</sup>H] Glutamate (ART0103) was purchased from Amersham International (Buckinghamshire, United Kingdom). Anti-nephrilysin (AB5458) and anti-IDE (AB9210) antibodies were obtained from Merck Millipore Corporation (São Paulo, Brazil). Anti-A $\beta$ <sub>1-40</sub> (sc-9129) antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Polyclonal anti-S100B (Z0311) and anti-GFAP (Z0334) antibodies were purchased from DAKO (São Paulo, Brazil) and anti-rabbit peroxidase (NA934V) and ECL Western blotting detection reagents (RPN3004) were purchased from GE (Little Chalfont, United Kingdom). Rhodamine phalloidin (R415) and acrylamide (15512-023) were purchased from Invitrogen (Waltham, MA, USA). The LDH activity kit (K014-2) was purchased from Bioclin (Belo Horizonte, Brazil). High-binding flat-bottomed plates (655081) used in enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) were purchased from Greiner Bio-One (Frickenhausen, Germany). All other chemicals were purchased from local commercial suppliers.

### 2.2. Cell Culture

Procedures were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Rio Grande do Sul (number 34855). Primary astrocyte cultures from Wistar rats were prepared as previously described [48]. Briefly, the cerebral cortices of newborn Wistar rats (1–4 days old) were removed and mechanically dissociated in Ca<sup>2+</sup>- and Mg<sup>2+</sup>-free Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), pH 7.4, containing (in mM): 137 NaCl; 2.66 KCl; 8.1 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1.47 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 5.55 glucose. After centrifugation at 300  $\times$  g for 5 min, the pellet was suspended in DMEM (pH 7.6) supplemented with 7.68 mM HEPES, 108.79 mM NaHCO<sub>3</sub>, 50 mg/L amphotericin B, 2.5 mg/L gentamicin and 10% fetal calf serum (FCS). Cells were seeded in 12-, 24-, or 96-well plates (800,000, 300,000 and 50,000 cells/well, respectively) pre-coated with poly-L-lysine. Cultures were maintained in DMEM containing 10% FCS in 5% CO<sub>2</sub>/95% air at 37 °C and the medium was changed every 3–4 days. Cells were allowed to grow to confluence and used at 21 days *in vitro*. We were unable to label neurons or microglia, using anti-NeuN or anti-Iba-1, respectively.

### 2.3. Experimental Design

The culture medium was replaced by DMEM without FCS (to avoid methodological interference from FCS) in the absence or presence of MG (from 5 to 500  $\mu\text{M}$ ), FC (from 1 to 100  $\mu\text{M}$ ), LPS (from 0.1 to 10  $\mu\text{g/mL}$ ), or STZ (from 2.5 to 250  $\mu\text{M}$ ), diluted in DPBS, which were used as the vehicles. The concentration range for each compound was chosen based on previous studies [23,49–51]. After 24 h of incubation, the extracellular medium was collected and cell scraping was used to collect the cells, as detailed in each methodological description. A schematic representation of the experimental procedure is shown in Figure 1.



**Figure 1.** Schematic representation of the experimental plan. Wistar rat astrocytes, cultured after reaching confluence, were exposed to MG (5; 50 or 500  $\mu\text{M}$ ), FC (1; 10 or 100  $\mu\text{M}$ ), LPS (0.1; 1 or 10  $\mu\text{g/mL}$ ), or STZ (2.5; 25 or 250  $\mu\text{M}$ ) for 24 h. After incubation, culture medium or intracellular lysate samples were collected for experimental analysis.

### 2.4. Methyl Thiazolyl Diphenyl-Tetrazolium Bromide Assay

Cells were incubated with 0.5 mg/mL methyl thiazolyl diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) during the last 30 min of the incubation. The medium was removed and the MTT formazan crystals formed by MTT reduction were dissolved in DMSO. Absorbance values were measured at 560 and 650 nm using Spetramax I3 equipment, and MTT reduction was calculated using the following formula:  $[(\text{abs } 560 \text{ nm}) - (\text{abs } 650 \text{ nm})]$ . Results were expressed as a percentage of control.

### 2.5. Neutral Red Incorporation Assay

Cells were treated with 50  $\mu\text{g/mL}$  neutral red (NR) for the last 30 min of the incubation. The medium was removed, and the cells were rinsed twice with phosphate-buffered saline (PBS: 50 mM NaCl, 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and 80 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4) for 5 min each time. NR dye taken up by viable cells was extracted with acetic acid/ethanol/water (1/50/49, v/v). Absorbance values were measured at 560 nm using the Spetramax I3 equipment, and results were expressed as a percentage of control.

### 2.6. Propidium Iodide Uptake Assay

Cells were treated with 7.5  $\mu\text{M}$  propidium iodide (PI) for the last 15 min of incubation. Fluorescence was measured using 625 nm (excitation) and 713 nm (emission) in Spetramax I3 equipment. Results were expressed as a percentage of control.

### 2.7. Assessment of Lactate Dehydrogenase Activity

The extracellular enzymatic activity of lactate dehydrogenase (LDH) was measured with a commercial assay from Bioclin (Belo Horizonte, Brazil). Briefly, 50  $\mu\text{L}$  of the extracellular medium was transferred to a 96-well plate. The substrate solution containing pyruvate and a solution containing NADH were added to the sample. The catalytic concentration was determined by the speed of decomposition of NADH, measured by the drop in absorbance at 340 nm during 4 min of testing using the Spetramax I3 equipment. Results were expressed as a percentage of control.



### 2.8. Cytochemistry for Actin and Nuclei

The cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min, rinsed with PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS (same composition as used in 2.5), for 10 min at room temperature. Afterward, to stain actin, the cells were incubated for 20 min with 2.5 U/mL rhodamine phalloidin, washed with 0.2% Triton X-100 in PBS, and then, nuclei were stained by 100  $\mu$ M bisbenzimidazole for 10 min. Cells were visualized using an Olympus CKX41 Inverted Fluorescence Microscope, and representative images were captured.

### 2.9. S100B Measurement

The medium was collected (for S100B secretion) and the cells were scraped and homogenized in PBS (same composition as used in 2.5), containing 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) and 1 mM EGTA (ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetracetic acid) with a syringe and needle (0.3 mm). S100B was measured by ELISA, as previously described [52]. Briefly, 50  $\mu$ L of the sample or standard (diluted in 0.2% albumin from chicken egg in PBS) plus 50  $\mu$ L of 50 mM tris buffer were incubated for 2 h at 37 °C on a microtiter plate previously coated overnight with monoclonal anti-S100B (diluted in carbonate buffer) at 4 °C and blocked for 1 h with 2% albumin from chicken egg in PBS at room temperature. Polyclonal anti-S100 (diluted in 0.5% albumin from chicken egg in PBS) was incubated for 30 min at 37 °C, and then, peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (diluted in 0.5% albumin from chicken egg in PBS) was added for 30 min at 37 °C. After incubating o-phenylenediamine for 30 min in the dark at room temperature, the colorimetric reaction was stopped with 3 M HCl and measured at 492 nm, using Spetramax I3 equipment. Data were compared with those of a standard curve (from 0.002 to 1 ng/mL) and intracellular S100B was normalized by the total protein content. Results are expressed as a percentage of control.

### 2.10. Glial Fibrillary Acidic Protein Measurement

The medium was removed, and the cells were scraped and homogenized in PBS containing 1 mM PMSF and 1 mM EGTA with a syringe and needle (0.3 mm). GFAP was measured by ELISA, as previously described [53]. Briefly, 50  $\mu$ L of standard or cell homogenate sample (diluted in 1 ng/ $\mu$ L bovine serum albumin) was incubated in a microtiter plate overnight at 4 °C and blocked for 2 h with 5% fat-free milk powder tris buffer solution (0.03 M 20 mM tris-HCl, pH 7.5, 0.5 M 137 mM NaCl) (M-TBS). Polyclonal anti-GFAP was incubated for 1 h at room temperature and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for 1 h at room temperature. After incubating with o-phenylenediamine for 30 min in the dark at room temperature, the colorimetric reaction was stopped with 3 M HCl and measured at 492 nm using the Spetramax I3 equipment. Data were compared with those of a standard curve (from 0.1 to 5 ng/mL) and normalized by the total protein content. Results were expressed as a percentage of control.

### 2.11. Glutamate Uptake Assay

Glutamate uptake was measured, as previously described by [54] with some modifications [55]. Briefly, cell cultures were incubated at 37 °C in Hank's balanced salt solution (HBSS), containing (in mM) 137 NaCl, 5.36 KCl, 1.26 CaCl<sub>2</sub>, 0.41 MgSO<sub>4</sub>, 0.49 MgCl<sub>2</sub>, 0.63 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0.44 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.17 NaHCO<sub>3</sub> and 5.6 glucose, pH 7.2. The assay was started by adding 0.1 mM L-glutamate and 0.05  $\mu$ Ci/mL L-[2,3-<sup>3</sup>H] glutamate. Incubation was stopped after 7 min by removing the medium and rinsing the cells three times with ice-cold HBSS. The cells were then lysed in a 0.5 M NaOH solution. Sodium-independent uptake was determined using N-methyl-D-glucamine instead of NaCl in the HBSS. Sodium-dependent glutamate uptake was obtained by subtracting the non-specific uptake from the total uptake to obtain the specific uptake. Radioactivity was measured in a PerkinElmer Tri-Carb 2300TR scintillation counter. Results were calculated and normalized by the total protein content and are expressed as a percentage of the control.

### 2.12. Reduced Glutathione Content Assay

The medium was removed, and the cells were scraped and homogenized in KCl phosphate buffer (140 mM, 20 mM, pH 7.4) using a syringe and needle (0.3 mm). Reduced glutathione (GSH) content was measured as previously described by [56]. Briefly, cell homogenates or standard GSH solution (0.977–500  $\mu$ M) were diluted in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0) containing 5 mM EDTA, and proteins were precipitated with 1.7% meta-phosphoric acid. The supernatant was incubated with o-phthaldialdehyde (1 mg/mL methanol) at room temperature for 15 min in a 96-well black microtiter plate. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 and 420 nm, respectively, in the Spetramax I3 equipment. Data were compared with those of the standard curve, normalized by the total protein content and expressed as a percentage of the control.

### 2.13. Glutamine Synthetase Activity

The medium was removed, and the cells were scraped in 50 mM imidazole. The enzymatic activity of glutamine synthetase (GS) was measured as previously described by [57], with modifications. Briefly, cell homogenates were diluted in 50 mM imidazole and incubated in the following manner: with (in mM) 50 imidazole, 50 hydroxylamine, 100 L-glutamine, 25 sodium arsenate dibasic heptahydrate, 0.2 ADP, 2 manganese chloride, pH 6.2 for 15 min at 37 °C. The reaction was stopped by adding 0.37 M FeCl<sub>3</sub>, 0.67 M HCl and 200 mM C<sub>2</sub>HCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>. After centrifugation, the absorbance of the supernatant was measured at 540 nm using the Spetramax I3 equipment and compared to the absorbance generated by standard quantities of L-glutamic acid  $\gamma$ -monohydroxamate diluted in the same solution as the samples. Data were normalized by the total protein content and expressed as a percentage of the control.

### 2.14. Western Blot Analysis

The medium was removed and the cells were scraped and homogenized in a sample buffer (0.0625 M tris-HCl, pH 6.8, 2% (*w/v*) SDS, 5% (*w/v*)  $\beta$ -mercaptoethanol, 10% (*v/v*) glycerol, 0.002% (*w/v*) bromophenol blue), boiled and then centrifuged at 10,000 $\times$  *g* for 5 min. Equal amounts (15  $\mu$ g) of total protein were electrophoresed in a 12% (*w/v*) SDS-polyacrylamide gel at 180 V for 1 h. The separated proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane at an amperage of 1.2 mA/cm<sup>2</sup> membrane area. Membranes were incubated in 0.05 tween TBS (same composition as used in 2.9) (T-TBS), containing 5% fat-free milk powder diluted in TBS (*w/v*) for 1 h at 4 °C. The membranes were incubated overnight at 4 °C with the appropriate primary antibody (diluted 1:5000 in 2.5% bovine serum albumin). Afterward, membranes were incubated overnight at 4 °C with peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (dilution 1:10,000 in 2.5% bovine serum albumin). Equivalent loading of each sample was confirmed with 0.5% India ink dye (in T-TBS containing 1% acetic acid) for 3 h [58]. The chemiluminescence signal was detected using an ECL kit from Amersham and evaluated in the luminescence image analyzer (Image Quant LAS4000 from GE). The luminescence signals were analyzed using ImageJ software, and the optical density was normalized by India ink optical density values. Results were expressed as a percentage of control.

### 2.15. Protein Content

Protein content was determined by Lowry's method modified by Peterson, using bovine serum albumin as a standard [59]. This method was used to measure total protein content for S100B, GFAP, glutamate uptake, GS and GSH assays.

### 2.16. Statistical Analysis

All analyses were carried out on a PC-compatible computer using SPSS software version 20.0. Parametric or non-parametric tests were used according to the sample number, and the normal distribution and homogeneity of variances were performed by the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. When normal distribution and homogeneity were

assumed, one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey post hoc testing, was performed to analyze 3 or more experimental groups. When homogeneity or normal distribution was not assumed, the non-parametric Mann–Whitney test was performed to analyze 2 experimental groups, or the Kruskal–Wallis test followed by pairwise comparison (Dunn–Bonferroni) to analyze 3 or more experimental groups. The statistical analyses are indicated in each of the figure legends. Significance was considered when  $p < 0.05$ .

### 3. Results

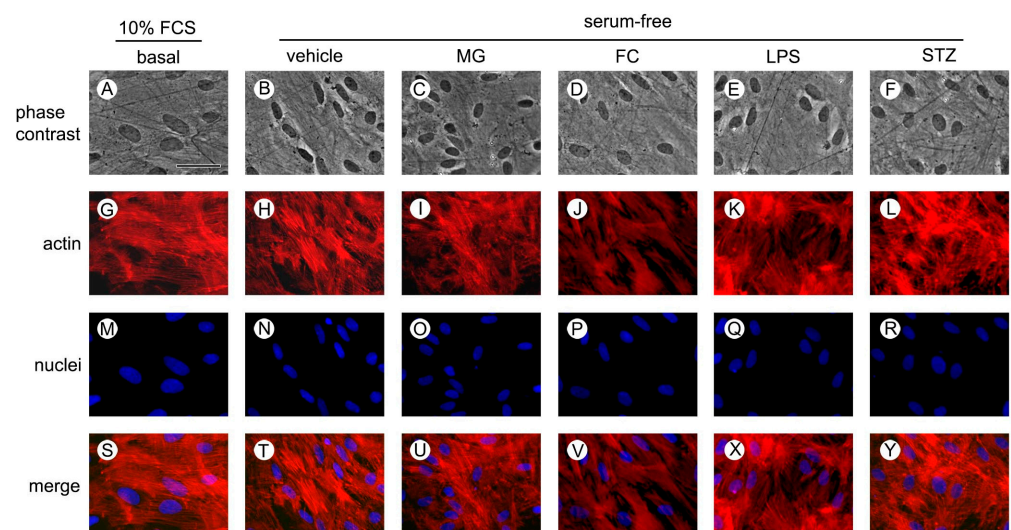
#### 3.1. MG, FC, LPS and STZ Do Not Compromise Cell Viability, Integrity and Morphology

To evaluate whether MG, FC, LPS or STZ, compounds that mimic some conditions involved in brain injury mechanisms, cause cell damage, cultured astrocytes were exposed to 500  $\mu\text{M}$  MG, 100  $\mu\text{M}$  FC, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS or 250  $\mu\text{M}$  STZ for 24 h before the assays. None of the compounds caused loss of cell viability, as evaluated by the MTT reduction and NR incorporation assays, or integrity, as assessed by measuring PI uptake and LDH extracellular activity. Interestingly, 100  $\mu\text{M}$  (F [4, 40] = 17.903,  $p < 0.001$ ) FC reduced LDH extracellular activity (Table 1). To evaluate if the compounds cause morphological changes, we analyzed the actin filaments assessed by the rhodamine phalloidin assay. After 24 h of exposure to 500  $\mu\text{M}$  MG, 100  $\mu\text{M}$  FC, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS or 250  $\mu\text{M}$  STZ, astrocytes maintained the polygonal shape and organization of actin filaments compared to the vehicle and to the culture's morphological aspect before the treatment (basal) (Figure 2).

**Table 1.** Effects of MG, FC, LPS and STZ on cell viability and integrity.

	MG 500 $\mu\text{M}$	FC 100 $\mu\text{M}$	LPS 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	STZ 250 $\mu\text{M}$
MTT	102.5 $\pm$ 3.3 ( $p = 1$ )	102.9 $\pm$ 3.3 ( $p = 0.645$ )	99.4 $\pm$ 2.1 ( $p = 0.706$ )	102.8 $\pm$ 2.0 ( $p = 1$ )
NR	101.1 $\pm$ 2.7 ( $p = 1$ )	107.1 $\pm$ 1.1 ( $p = 0.999$ )	101.8 $\pm$ 3.6 ( $p = 1$ )	100.9 $\pm$ 4.0 ( $p = 0.844$ )
PI	103.5 $\pm$ 2.4 ( $p = 1$ )	89.1 $\pm$ 3.7 ( $p = 0.074$ )	97.5 $\pm$ 3.4 ( $p = 0.768$ )	98.7 $\pm$ 2.2 ( $p = 0.875$ )
LDH	101.0 $\pm$ 5.3 ( $p = 1$ )	59.4 $\pm$ 5.6 ( $p < 0.001$ ) *	96.2 $\pm$ 4.5 ( $p = 0.819$ )	97.1 $\pm$ 4.7 ( $p = 0.934$ )

Statistical analyses were performed with one-way ANOVA followed by Tukey post hoc. Data are presented as mean  $\pm$  standard error. \* indicates difference from vehicle ( $n = 4$ –8). ANOVA, analysis of variance; FC, fluorocitrate; LDH, lactate dehydrogenase extracellular activity; LPS, lipopolysaccharide; MG, methylglyoxal; MTT, methyl thiazolyl diphenyl-tetrazolium bromide reduction; NR, neutral red incorporation; PI, propidium iodide uptake; STZ, streptozotocin.

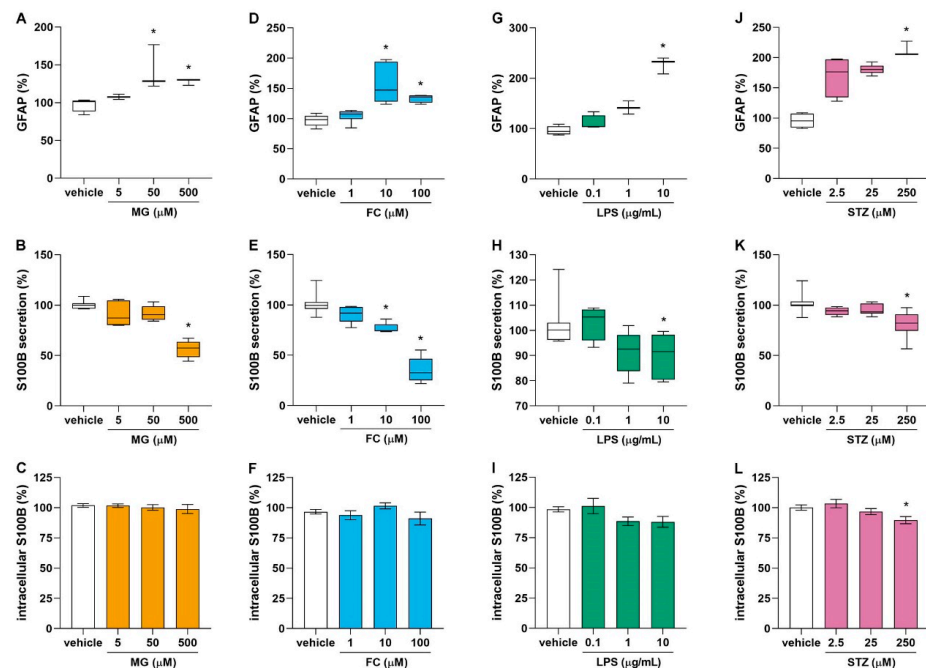


**Figure 2.** Morphological evaluation of astrocytes. Astrocytes were fixed before (10% FCS DMEM) or after (serum-free DMEM) exposure to 500  $\mu\text{M}$  MG; 100  $\mu\text{M}$  FC; 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS or 250  $\mu\text{M}$  STZ for 24 h for visualization. Representative images of phase contrast (A–F), actin staining with rhodamine phalloidin in red (G–L), nuclei staining with bisbenzimidazole in blue (M–R) and merged images (S–Y). Scale bar = 50  $\mu\text{m}$  (shown in (A)). DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FCS, fetal calf serum; FC, fluorocitrate; LPS, lipopolysaccharide; MG, methylglyoxal; STZ, streptozotocin.



### 3.2. MG, FC, LPS and STZ Affect Astrocyte Protein Markers

S100B and GFAP are characteristic astrocyte proteins and can be altered by numerous pathological conditions. We evaluated the intracellular contents of GFAP and S100B, as well as the S100B secretion from cultured astrocytes after 24 h of exposure to different concentrations of MG (from 5 to 500  $\mu\text{M}$ ), FC (from 1 to 100  $\mu\text{M}$ ), LPS (from 0.1 to 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or STZ (from 2.5 to 250  $\mu\text{M}$ ). These compounds caused a similar response profile of the astrocytes in terms of the S100B secretion and the contents of S100B and GFAP. We observed that 50  $\mu\text{M}$  ( $H[3] = 12.158, p = 0.031$ ) and 500  $\mu\text{M}$  ( $H[3] = 12.158, p = 0.022$ ) MG increased GFAP content (Figure 3A), and 500  $\mu\text{M}$  ( $H[3] = 13.280, p = 0.002$ ) MG caused a reduction in S100B secretion (Figure 3B). For FC, 10  $\mu\text{M}$  ( $H[3] = 16.856, p = 0.002$ ) and 100  $\mu\text{M}$  ( $H[3] = 12.158, p = 0.034$ ) (Figure 3D) increased GFAP content, and also 10  $\mu\text{M}$  ( $H[3] = 22.916, p = 0.040$ ) and 100  $\mu\text{M}$  ( $H[3] = 22.916, p < 0.001$ ) FC caused a reduction in S100B secretion (Figure 3E). For LPS, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $H[3] = 11.507, p = 0.009$ ) (Figure 3G) increased GFAP content, and S100B secretion was found to be reduced by 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $H[3] = 13.789, p = 0.032$ ) LPS (Figure 3H). For STZ, the GFAP content was increased by 250  $\mu\text{M}$  ( $H[3] = 12.525, p = 0.003$ ) STZ (Figure 3J), 250  $\mu\text{M}$  ( $H[3] = 17.489, p < 0.001$ ) STZ caused a reduction in S100B secretion (Figure 3K), and only 250  $\mu\text{M}$  ( $F[3, 22] = 4.470, p = 0.040$ ) STZ caused a decrease in the astrocytes' S100B content (Figure 3L).

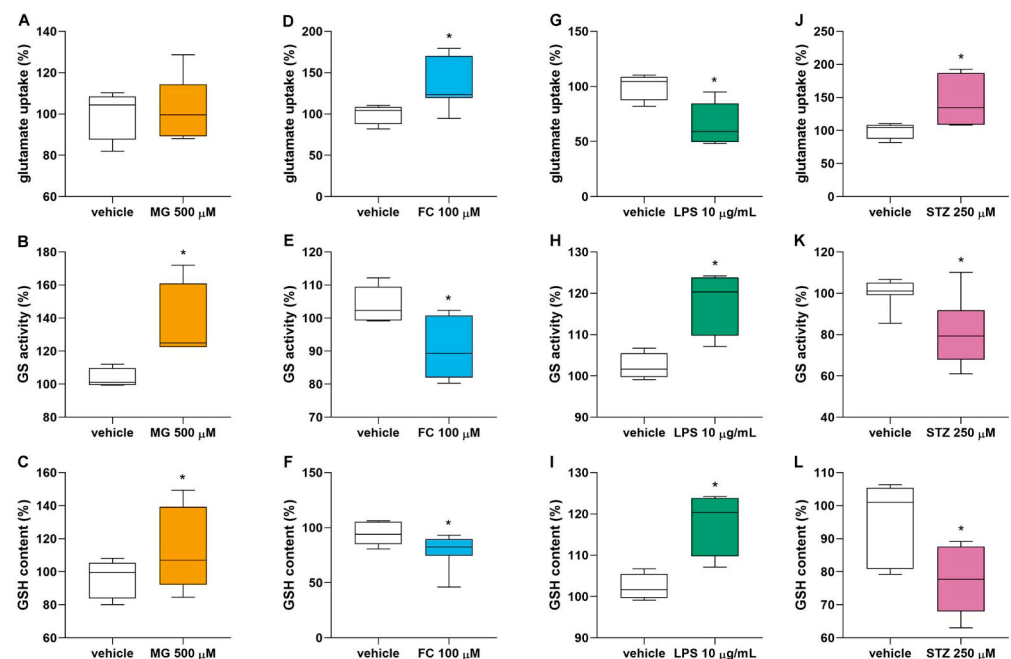


**Figure 3.** Effects of MG, FC, LPS and STZ on GFAP content, S100B secretion and S100B content. GFAP intracellular content, S100B secretion and S100B content were measured by ELISA in the astrocytes culture after 24 h of exposition to (A–C) MG (from 5 to 500  $\mu\text{M}$ ) ( $n = 3$ –7), (D–F) FC (from 1 to 100  $\mu\text{M}$ ) ( $n = 5$ –6), (G–I) LPS (from 0.1 to 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $n = 3$ –8) or (J–L) STZ (from 2.5 to 250  $\mu\text{M}$ ) ( $n = 3$ –10). Statistical analysis was performed with the Kruskal–Wallis test followed by pairwise comparison (Dunn–Bonferroni) for (A,B,D,E,G,H,J,K) or one-way ANOVA followed by Tukey post hoc for (C,F,I,L). Data are presented as mean  $\pm$  standard error (when ANOVA was applied). \* indicates difference from vehicle. ANOVA, analysis of variance; FC, fluorocitrate; GFAP, glial fibrillary acidic protein; LPS, lipopolysaccharide; MG, methylglyoxal; STZ, streptozotocin.

### 3.3. MG, FC, LPS and STZ Affect the Glutamate Metabolism of Astrocytes

Astrocytes have the important function of removing and metabolizing glutamate from the synaptic cleft, in addition to producing GSH. To evaluate whether this important

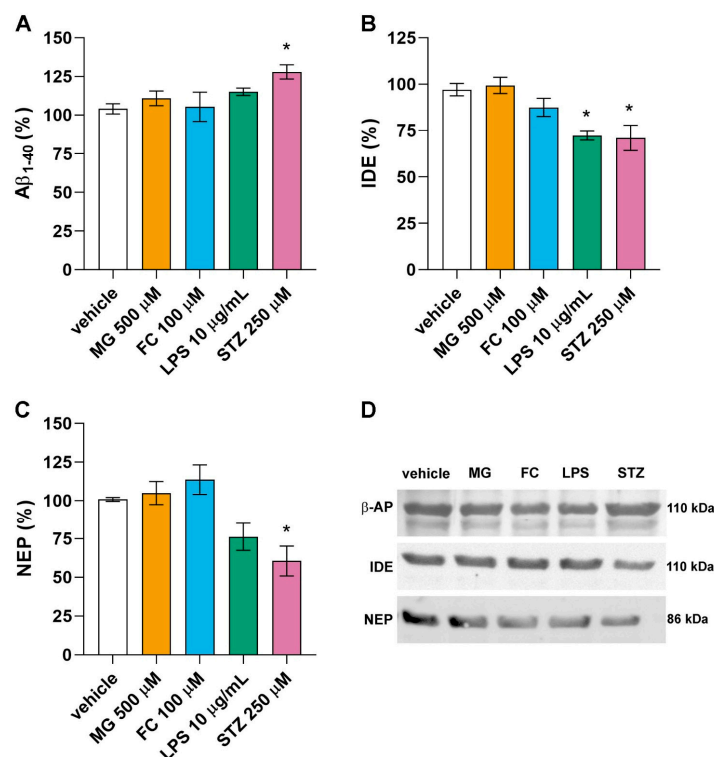
function of astrocytes is affected by different biochemical conditions associated with the brain injury process, we evaluated the glutamate uptake, GSH content and GS activity in astrocytes exposed to 500  $\mu$ M MG, 100  $\mu$ M FC, 10  $\mu$ g/mL LPS, or 250  $\mu$ M STZ for 24 h (Figure 4). MG (Figure 4A) did not affect astrocytic glutamate uptake, but increased GS activity (U < 0.001,  $p$  = 0.021) (Figure 4B) and GSH content (U = 30.000,  $p$  = 0.045) (Figure 4C). FC increased glutamate uptake (U = 5.000,  $p$  = 0.013) (Figure 4D), whereas it decreased GS activity (U = 3.000,  $p$  = 0.047) (Figure 4E) and GSH content (U = 17.000,  $p$  = 0.025) (Figure 4F). LPS decreased glutamate uptake (U = 2.000,  $p$  = 0.012) (Figure 4G), whereas it increased GS activity (U < 0.001,  $p$  = 0.021) (Figure 4H) and GSH content (U < 0.001,  $p$  = 0.021) (Figure 4I). STZ increased glutamate uptake (U = 3.000,  $p$  = 0.019) (Figure 4J), whereas it decreased GS activity (U = 0.000,  $p$  = 0.016) (Figure 4K) and GSH content (U = 6.000,  $p$  = 0.018) (Figure 4L).



**Figure 4.** Effects of MG, FC, LPS and STZ on astrocytic glutamate metabolism. Glutamate uptake, GS activity and GSH content were measured in the astrocytes culture after 24 h of exposition to (A–C) 500  $\mu$ M MG (n = 3–11), (D–F) 100  $\mu$ M FC (n = 5–7), (G–I) 10  $\mu$ g/mL LPS (n = 4–5) or (J–L) 250  $\mu$ M STZ (n = 5–8). Statistical analysis was performed with the Mann–Whitney test. Data are presented as box-and-whiskers plots, where the bottom and the top of the box represent the min to max, and the horizontal line is the median. \* indicates difference from vehicle. FC, fluorocitrate; GS, glutamine synthetase; GSH, reduced glutathione; LPS, lipopolysaccharide; MG, methylglyoxal; STZ, streptozotocin.

### 3.4. Only LPS and STZ Affect Proteins Involved in the Amyloid Cascade

Astrocytes are involved in early alterations observed in neurodegenerative diseases, such as AD. To evaluate the role of astrocytes in the amyloid cascade, under our experimental conditions, we evaluated some of the proteins involved in the A $\beta$  accumulation process (A $\beta$ 1-40, IDE and NEP) in astrocytes exposed to 500  $\mu$ M MG, 100  $\mu$ M FC, 10  $\mu$ g/mL LPS, or 250  $\mu$ M STZ for 24 h. Only LPS and STZ altered the content of these proteins. LPS decreased the astrocytes' content of IDE (F[4, 15] = 8.420,  $p$  = 0.013) (Figure 5B). STZ increased the A $\beta$ 1-40 peptide content (F[4, 21] = 3.039,  $p$  = 0.036) (Figure 5A), accompanied by a decrease in the content of the amyloid degradation enzymes, IDE (F[4, 15] = 8.420,  $p$  = 0.009) (Figure 5B) and NEP (F[4, 16] = 7.177,  $p$  = 0.026) (Figure 5C).



**Figure 5.** Effects of MG, FC, LPS and STZ on amyloid metabolism. Astrocyte cultures were exposed to 500 μM MG; 100 μM FC; 10 μg/mL LPS or 250 μM STZ for 24 h to evaluate the intracellular content of (A) Aβ<sub>1-40</sub> (n = 4–6), (B) IDE (n = 4) and (C) NEP (n = 4–5). In (D), representative images of immunoblots. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA followed by Tukey post hoc. Data are presented as mean ± standard error. \* indicates difference from vehicle. Aβ<sub>1-40</sub>, amyloid beta; ANOVA, analysis of variance; FC, fluorocitrate; IDE, insulin-degrading enzyme; LPS, lipopolysaccharide; MG, methylglyoxal; NEP, neprilysin; STZ, streptozotocin.

#### 4. Discussion

Astrocytes play a crucial role in maintaining brain homeostasis in the CNS, and dysfunction of astrocytes has been reported during the early phases of some brain disorders [3,46], emphasizing the importance of understanding the roles of astrocytic alterations in this context. Biochemical and metabolic alterations that cause or contribute to the development of cognitive impairment include glucose homeostasis disruption, neuroinflammation and the formation of protein aggregates [13]. As such, we selected four different compounds to mimic some important characteristics associated with the initiation or progression of cognitive disorders, aiming to study some astrocytic metabolic features within this context: MG (used to mimic high glucose and DM in vivo), FC (an inhibitor of energy metabolism), LPS (used to induce neuroinflammation), and STZ (used to induce AD in animal models).

To choose the concentration of use of the compounds, we first exposed the astrocyte cultures to different concentrations of MG, FC, LPS or STZ and evaluated the level of GFAP and S100B, which are frequently associated with brain disorders [9,60]. In fact, they seem to be an essential astrocytic response mechanism, as all of the stimuli tested on the astrocytes induced the same response profile: an increase in astrocytic GFAP levels and a decrease in S100B secretion without evidence of cell damage. A previous study from our group showed that hippocampal slices exposed to MG presented diminished S100B secretion; furthermore, in vivo, MG ICV administration modulated S100B in the short term (72 h) [25] but not over a more extended period (6 weeks) [24]. With regard to FC, reductions in S100B secretion have previously been observed in hippocampal slices and astrocyte cultures after 1 h of exposure [50]. We found that this effect persists until 24 h and

that astrocytes also exhibited increased GFAP. Interestingly, in animal models, FC reduced the elevation in GFAP caused by LPS in a depression-like model [61]. Corroborating our results, several studies have described the effects of LPS on S100B and GFAP in isolated astrocytes [49,62–65]. In STZ-induced AD, the increase in GFAP brain levels precedes A $\beta$  accumulation and NFT formation [39,41,66]. Similarly, S100B, considered a cerebral damage marker, is increased in AD patients' serum, whereas its levels in the CSF demonstrate discrepant results (see Gonçalves et al., 2008 for a review). On the other hand, in STZ-induced AD, S100B is decreased in the CSF and elevated in the hippocampus within a short time after injection (one week) and increased in the CSF and decreased in the hippocampus after 4 weeks [67]. Similarly, in acute hippocampus slices, S100B was reduced by STZ after 1 h [41]. Our data corroborated these findings in cultured astrocytes. The significance of cerebral GFAP and S100B levels should be discussed according to the context [68]; here, considering situations involved with brain damage, all of the compounds tested showed a similar profile, suggesting astrocytic dysfunction, as found in neurodegenerative diseases.

Based on the effects observed on S100B and GFAP, we investigated astrocytic function, assessing some features related to glutamate and A $\beta$  metabolism by the highest concentration of MG, FC, LPS or STZ. Astrocytes play an important role in glutamate detoxification via the glutamate–glutamine cycle, and dysfunctions in this system have been observed in cognitive disorders [10,69]. Mimicking a DM2 condition in astrocytes, MG increased GSH content and GS activity without affecting the glutamate uptake. This could represent a protective mechanism in astrocytes from MG, as previously observed in an astrocyte culture incubated with 1 mM MG, which was found to cause increases in GSH and glyoxalase 1 enzyme in association with a decrease in glutamate uptake [23]. The most prevalent type of dementia is AD, characterized, among other alterations, by A $\beta$  accumulation due to an imbalance in its production and clearance. A $\beta$  clearance by astrocytes plays a critical role in AD development, and a decreased rate of A $\beta$  clearance has been reported in AD patients [70,71]. As such, astrocytes express enzymes that degrade A $\beta$ , such as NEP and IDE [47,72]. Alterations in these enzymes during the early stages of AD have been reported as crucial to disease progression [45,47]. Glycation reactions are suggested to enhance A $\beta$  formation pathways in amyloid precursor protein (APP) processing mechanisms [73], and the clearance of A $\beta$  by astrocytes was impaired after inhibiting insulin signaling pathways, in turn reducing NEP and IDE levels [74]. Despite that, the alterations in glycation induced by MG in our conditions did not impact these targets involved in the A $\beta$  metabolism.

The inhibition of energy metabolism by FC had a different profile regarding glutamate metabolism. In this scenario, we observed an increase in glutamate uptake, a decrease in GSH content and no change in GS enzyme activity. Previous studies showed an impairment of glutamate metabolism, leading to reductions in glutamate uptake and glutamine synthesis [75,76]. Paulsen and co-workers observed a similar result after 4 h of an intrastriatal administration of FC, which was reversed in 24 h [77]. Energy hypometabolism is found in AD patients, and evidence suggests this is important at the beginning of AD [78]. Although the effects of FC on AD are not entirely understood, in an animal model of AD induced by A $\beta$ 1-42 injection in the hippocampus, FC was found to reduce the acquisition of spatial memory [79] and also increased tau phosphorylation in the hippocampus [80]. Regarding A $\beta$ -metabolism and its accumulation, similarly to MG, FC did not cause any alteration in our conditions.

Inflammation is a crucial mechanism shared by many neurodegenerative diseases. The excitotoxicity and the increase in Ca<sup>+2</sup> influx in the neural cells may be caused by an impaired glutamate uptake by astrocytes. Accordingly, we observe that LPS-induced inflammation decreased glutamate uptake, suggesting an accumulation of glutamate in the synaptic cleft possibly leading to excitotoxicity, as shown in neuronal cell cultures, hippocampus slices and cerebral cortex tissue [81–83]. Further, we found an increase in GS enzyme activity and no alterations in GSH content in astrocytes. A decrease in GSH content was observed in cultured astrocytes exposed to LPS (from 0.01 to 30  $\mu$ g/mL, except at 1  $\mu$ g/mL) for 24 h [49]. Similarly, hippocampus slices exposed to 10  $\mu$ M/mL LPS for 6 h

showed a reduction in glutamate uptake and GSH content [83]. Different from what we observed for MG and FC, LPS induced a decrease in IDE protein expression in astrocytes without changes in A $\beta$  intracellular content. Indeed, neuroinflammation is reported to represent a critical alteration in AD development [84,85]. The role of inflammation in the amyloidogenic pathway was indicated in astrocytes by the increased expressions of proteins such as APP and BACE [86]. We demonstrated that LPS is also involved in AD development by impairing the A $\beta$  clearance mechanisms of astrocytes before the accumulation of A $\beta$ .

ICV injection of STZ is widely used as a model of AD in animals, although most in vitro models have explored its effect on neurons [51,87,88]. The mechanisms by which STZ induces AD development are not fully understood, but it has been proposed that this compound can enter neurons through GLUT2 and affect the insulin receptor, thereby improving the GSK3 pathway [89]. After exposing the astrocytes to STZ, we found an increase in glutamate uptake, but decreased GSH levels and GS activity. Indeed, the effects of STZ on GSH and GS have been extensively shown in animal models from 1 to 8 weeks after STZ administration [43,68,90]. In this work, we showed, for the first time, that these effects are directly related to astrocyte function. An in vivo study measured glutamate uptake in hippocampal slices 4 weeks after STZ administration, and it was not altered. Notably, at this stage, the animal already shows some late alterations consistent with AD, such as cognitive damage [90]. In isolated astrocytes, an increase in glutamate uptake was observed at 24 h, probably indicating a compensatory mechanism during the early stages. Regarding A $\beta$  metabolism, STZ was the only compound tested in this work that caused a reduction in IDE and NEP protein contents associated with an increase in A $\beta$ 1-40 content. In previous work using neuronal primary culture, 8 mM STZ increased the mRNA expressions of APP, MAPT, GSK3 $\alpha$  and GSK3 $\beta$  at 24 h; all of these pathways are involved in A $\beta$  production and tau phosphorylation [87]. Herein, we showed that STZ could directly affect astrocytic mechanisms involved in AD, such as clearance by NEP and IDE, and therefore contribute to A $\beta$  accumulation.

It is worth highlighting that the profile of alterations caused by the model using STZ ICV injection to induce AD in animals was reproduced in isolated astrocytes in this study regarding GFAP, S100B, GS and GSH measurements. In addition, our data related to amyloid metabolism showed a direct response of astrocytes to STZ in the AD context. Together, these findings suggest that the use of STZ is appropriate for the study of the role of astrocytes in AD in an in vitro model.

## 5. Conclusions

We showed that high glucose concentrations, astrocyte inhibition, neuroinflammation and AD development characteristics mimicked by MG, FC, LPS and STZ caused astrocyte activation and decreased S100B secretion. However, the insults used affected the glutamate metabolism of astrocytes differently, and only STZ reduced both the A $\beta$  degrading enzymes, NEP and IDE, and caused elevations in A $\beta$  levels. Thus, all of the compounds affect astrocytes, altering cellular functions and contributing to the progression of brain disorders such as AD, but STZ seems to provide a better model to study the role of astrocytes in some features of AD in vitro.

**Author Contributions:** J.T., M.C.L. and C.A.G.; conception and design of the work. J.T., F.T.F. and M.S.; data collection. J.T., M.C.L., C.A.G., F.T.F. and M.S.; analysis and interpretation. M.C.L. and C.A.G.; funding acquisition. J.T., M.C.L. and C.A.G.; writing the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant number 430752/2018-0; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), grant number 001; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), grant number 16/0465-0 and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCTEN), grant number 465671/2014-4.



**Institutional Review Board Statement:** The procedures were in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and approved by the local authorities (number 34855, approved on 18 September 2018).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The raw data supporting the results of this study are, by collective decision of the authors, available from the corresponding author [MC Leite] upon request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no competing interests.

## References

1. Pekny, M.; Pekna, M.; Messing, A.; Steinhäuser, C.; Lee, J.M.; Parpura, V.; Hol, E.M.; Sofroniew, M.V.; Verkhratsky, A. Astrocytes: A Central Element in Neurological Diseases. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 323–345. [\[CrossRef\]](#)
2. Blanco-Suárez, E.; Caldwell, A.L.M.; Allen, N.J. Role of Astrocyte–Synapse Interactions in CNS Disorders. *J. Physiol.* **2017**, *595*, 1903–1916. [\[CrossRef\]](#)
3. Chung, W.-S.; Welsh, C.A.; Barres, B.A.; Stevens, B. Do Glia Drive Synaptic and Cognitive Impairment in Disease? *Nat. Neurosci.* **2015**, *18*, 1539–1545. [\[CrossRef\]](#)
4. Pérez Palmer, N.; Trejo Ortega, B.; Joshi, P. Cognitive Impairment in Older Adults: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Psychiatr. Clin. N. Am.* **2022**, *45*, 639–661. [\[CrossRef\]](#)
5. Gauthier, S.; Webster, C.; Servaes, S.; Morais, J.A.; Rosa-Neto, P. *World Alzheimer Report 2022: Life after Diagnosis: Navigating Treatment, Care and Support*; Alzheimer’s Disease International: London, UK, 2022; pp. 1–414.
6. Rae, C.D.; Baur, J.A.; Borges, K.; Dienel, G.; Díaz, C.M.; Starlette, G.; Kelly, R.D.; Duarte, J.M.N.; Liu, D.L.; Lindquist, B.E.; et al. Brain Energy Metabolism: A Roadmap for Future Research. *J. Neurochem.* **2024**, 1–45. [\[CrossRef\]](#)
7. Santello, M.; Toni, N.; Volterra, A. Astrocyte Function from Information Processing to Cognition and Cognitive Impairment. *Nat. Neurosci.* **2019**, *22*, 154–166. [\[CrossRef\]](#)
8. 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*, 637–668. [\[CrossRef\]](#)
9. Escartin, C.; Galea, E.; Lakatos, A.; O’Callaghan, J.P.; Petzold, G.C.; Serrano-Pozo, A.; Steinhäuser, C.; Volterra, A.; Carmignoto, G.; Agarwal, A.; et al. Reactive Astrocyte Nomenclature, Definitions, and Future Directions. *Nat. Neurosci.* **2021**, *24*, 312–325. [\[CrossRef\]](#)
10. Andersen, J.V.; Markussen, K.H.; Jakobsen, E.; Schousboe, A.; Waagepetersen, H.S.; Rosenberg, P.A.; Aldana, B.I. Glutamate Metabolism and Recycling at the Excitatory Synapse in Health and Neurodegeneration. *Neuropharmacology* **2021**, *196*, 108719. [\[CrossRef\]](#)
11. Palmer, A.L.; Ousman, S.S. Astrocytes and Aging. *Front. Aging Neurosci.* **2018**, *10*, 337. [\[CrossRef\]](#)
12. Leclerc, B.; Abulrob, A. Perspectives in Molecular Imaging Using Staging Biomarkers and Immunotherapies in Alzheimer’s Disease. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 589308–589323. [\[CrossRef\]](#)
13. Gonzales, M.M.; Garbarino, V.R.; Pollet, E.; Palavicini, J.P.; Kellogg, D.L.; Kraig, E.; Orr, M.E. Biological Aging Processes Underlying Cognitive Decline and Neurodegenerative Disease. *J. Clin. Investig.* **2022**, *132*, e158453. [\[CrossRef\]](#)
14. Hassel, B.; Westergaard, N.; Schousboe, A.; Fonnum, F. Metabolic Differences between Primary Cultures of Astrocytes and Neurons from Cerebellum and Cerebral Cortex. Effects of Fluorocitrate. *Neurochem. Res.* **1995**, *20*, 413–420. [\[CrossRef\]](#)
15. Zhang, X.; Shen, X.; Dong, J.; Liu, W.C.; Song, M.; Sun, Y.; Shu, H.; Towse, C.L.; Liu, W.; Liu, C.F.; et al. Inhibition of Reactive Astrocytes with Fluorocitrate Ameliorates Learning and Memory Impairment Through Upregulating CRT1 and Synaptophysin in Ischemic Stroke Rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2019**, *39*, 1151–1163. [\[CrossRef\]](#)
16. Zhang, H.Y.; Wang, Y.; He, Y.; Wang, T.; Huang, X.H.; Zhao, C.M.; Zhang, L.; Li, S.W.; Wang, C.; Qu, Y.N.; et al. A1 Astrocytes Contribute to Murine Depression-like Behavior and Cognitive Dysfunction, Which Can Be Alleviated by IL-10 or Fluorocitrate Treatment. *J. Neuroinflamm.* **2020**, *17*, 200. [\[CrossRef\]](#)
17. Rezagholizadeh, A.; Karimi, S.A.; Hosseinmardi, N.; Janahmadi, M.; Sayyah, M. The Effects of Glial Cells Inhibition on Spatial Reference, Reversal and Working Memory Deficits in a Rat Model of Traumatic Brain Injury (TBI). *Int. J. Neurosci.* **2022**, *132*, 226–236. [\[CrossRef\]](#)
18. Rae, C.; Fekete, A.D.; Kashem, M.A.; Nasrallah, F.A.; Bröer, S. Metabolism, Compartmentation, Transport and Production of Acetate in the Cortical Brain Tissue Slice. *Neurochem. Res.* **2012**, *37*, 2541–2553. [\[CrossRef\]](#)
19. Jash, K.; Gondaliya, P.; Kirave, P.; Kulkarni, B.; Sunkaria, A.; Kalia, K. Cognitive Dysfunction: A Growing Link between Diabetes and Alzheimer’s Disease. *Drug Dev. Res.* **2020**, *81*, 144–164. [\[CrossRef\]](#)
20. Shopit, A.; Niu, M.; Wang, H.; Tang, Z.; Li, X.; Tesfaldet, T.; Ai, J.; Ahmad, N.; Al-Azab, M.; Tang, Z. Protection of Diabetes-Induced Kidney Injury by Phosphocreatine via the Regulation of ERK/Nrf2/HO-1 Signaling Pathway. *Life Sci.* **2020**, *242*, 117248. [\[CrossRef\]](#)
21. Cho, C.H.; Lee, C.J.; Kim, M.G.; Ryu, B.; Je, J.G.; Kim, Y.; Lee, S.H. Therapeutic Potential of Phlorotannin-Rich Ecklonia Cava Extract on Methylglyoxal-Induced Diabetic Nephropathy in In Vitro Model. *Mar. Drugs* **2022**, *20*, 355. [\[CrossRef\]](#)

22. Karumanchi, D.K.; Karunaratne, N.; Lurio, L.; Dillon, J.P.; Gaillard, E.R. Non-Enzymatic Glycation of  $\alpha$ -Crystallin as an in Vitro Model for Aging, Diabetes and Degenerative Diseases. *Amino Acids* **2015**, *47*, 2601–2608. [[CrossRef](#)]
23. Hansen, F.; Galland, F.; Lirio, F.; De Souza, D.F.; Da Ré, C.; Pacheco, R.F.; Vizuete, A.F.; Quincozes-Santos, A.; Leite, M.C.; Gonçalves, C.A. Methylglyoxal Induces Changes in the Glyoxalase System and Impairs Glutamate Uptake Activity in Primary Astrocytes. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2017**, *2017*, 9574201–9574211. [[CrossRef](#)]
24. Hansen, F.; Pandolfo, P.; Galland, F.; Torres, F.V.; Dutra, M.F.; Batassini, C.; Guerra, M.C.; Leite, M.C.; Gonçalves, C.A. Methylglyoxal Can Mediate Behavioral and Neurochemical Alterations in Rat Brain. *Physiol. Behav.* **2016**, *164*, 93–101. [[CrossRef](#)]
25. Lissner, L.J.; Rodrigues, L.; Wartchow, K.M.; Borba, E.; Bobermin, L.D.; Fontella, F.U.; Hansen, F.; Quincozes-Santos, A.; Souza, D.O.G.; Gonçalves, C.A. Short-Term Alterations in Behavior and Astroglial Function after Intracerebroventricular Infusion of Methylglyoxal in Rats. *Neurochem. Res.* **2021**, *46*, 183–196. [[CrossRef](#)]
26. Allaman, I.; Bélanger, M.; Magistretti, P.J. Methylglyoxal, the Dark Side of Glycolysis. *Front. Neurosci.* **2015**, *9*, 23. [[CrossRef](#)]
27. Ott, C.; Jacobs, K.; Haucke, E.; Navarrete Santos, A.; Grune, T.; Simm, A. Role of Advanced Glycation End Products in Cellular Signaling. *Redox Biol.* **2014**, *2*, 411–429. [[CrossRef](#)]
28. Hofmann, M.A.; Drury, S.; Fu, C.; Qu, W.; Taguchi, A.; Lu, Y.; Avila, C.; Kambham, N.; Bierhaus, A.; Nawroth, P.; et al. RAGE Mediates a Novel Proinflammatory Axis: A Central Cell Surface Receptor for S100/Calgranulin Polypeptides. *Cell* **1999**, *97*, 889–901. [[CrossRef](#)]
29. Hansen, F.; Battú, C.E.; Dutra, M.F.; Galland, F.; Lirio, F.; Broetto, N.; Nardin, P.; Gonçalves, C.A. Methylglyoxal and Carboxyethyllysine Reduce Glutamate Uptake and S100B Secretion in the Hippocampus Independently of RAGE Activation. *Amino Acids* **2016**, *48*, 375–385. [[CrossRef](#)]
30. Angeloni, C.; Zamboni, L.; Hrelia, S. Role of Methylglyoxal in Alzheimer's Disease. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 238485. [[CrossRef](#)]
31. Shi, D.Y.; Bierhaus, A.; Nawroth, P.P.; Stern, D.M. RAGE and Alzheimer's Disease: A Progression Factor for Amyloid- $\beta$ -Induced Cellular Perturbation? *J. Alzheimer's Dis.* **2009**, *16*, 833–843. [[CrossRef](#)]
32. Stephenson, J.; Nutma, E.; van der Valk, P.; Amor, S. Inflammation in CNS Neurodegenerative Diseases. *Immunology* **2018**, *154*, 204–219. [[CrossRef](#)]
33. Singh, S.; Sahu, K.; Singh, C.; Singh, A. Lipopolysaccharide Induced Altered Signaling Pathways in Various Neurological Disorders. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2022**, *395*, 285–294. [[CrossRef](#)]
34. Zakaria, R.; Wan Yaacob, W.M.; Othman, Z.; Long, I.; Ahmad, A.H.; Al-Rahbi, B. Lipopolysaccharide-Induced Memory Impairment in Rats: A Model of Alzheimer's Disease. *Physiol. Res.* **2017**, *66*, 553–565. [[CrossRef](#)]
35. Płóciennikowska, A.; Hromada-Judycka, A.; Borzęcka, K.; Kwiatkowska, K. Co-Operation of TLR4 and Raft Proteins in LPS-Induced pro-Inflammatory Signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 557–581. [[CrossRef](#)]
36. Trotta, T.; Porro, C.; Calvello, R.; Panaro, M.A. Biological Role of Toll-like Receptor-4 in the Brain. *J. Neuroimmunol.* **2014**, *268*, 1–12. [[CrossRef](#)]
37. Masters, C.L.; Bateman, R.; Blennow, K.; Rowe, C.C.; Sperling, R.A.; Cummings, J.L. Alzheimer's Disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2015**, *1*, 15056. [[CrossRef](#)]
38. De Strooper, B.; Karran, E. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell* **2016**, *164*, 603–615. [[CrossRef](#)]
39. Mishra, S.K.; Singh, S.; Shukla, S.; Shukla, R. Intracerebroventricular Streptozotocin Impairs Adult Neurogenesis and Cognitive Functions via Regulating Neuroinflammation and Insulin Signaling in Adult Rats. *Neurochem. Int.* **2018**, *113*, 56–68. [[CrossRef](#)]
40. Huf, F.; Gutierrez, J.M.; da Silva, G.N.; Zago, A.M.; Koenig, L.F.C.; Fernandes, M.C. Neuroprotection Elicited by Taurine in Sporadic Alzheimer-like Disease: Benefits on Memory and Control of Neuroinflammation in the Hippocampus of Rats. *Mol. Cell. Biochem.* **2023**, *2023*, 1–16. [[CrossRef](#)]
41. Rodrigues, L.; Wartchow, K.M.; Suardi, L.Z.; Federhen, B.C.; Selistre, N.G.; Gonçalves, C.A. Streptozotocin Causes Acute Responses on Hippocampal S100B and BDNF Proteins Linked to Glucose Metabolism Alterations. *Neurochem. Int.* **2019**, *128*, 85–93. [[CrossRef](#)]
42. Akhtar, A.; Gupta, S.M.; Dwivedi, S.; Kumar, D.; Shaikh, M.F.; Negi, A. Preclinical Models for Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future Approaches. *ACS Omega* **2022**, *7*, 47504–47517. [[CrossRef](#)]
43. Rodrigues, L.; Biasibetti, R.; Swarowsky, A.; Leite, M.C.; Quincozes-Santos, A.; Quilfeldt, J.A.; Achaval, M.; Goncalves, C.A. Hippocampal Alterations in Rats Submitted to Streptozotocin-Induced Dementia Model Are Prevented by Aminoguanidine. *J. Alzheimer's Dis.* **2009**, *17*, 193–202. [[CrossRef](#)]
44. Grieb, P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: In Search of a Relevant Mechanism. *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53*, 1741–1752. [[CrossRef](#)]
45. Davis, N.; Mota, B.C.; Stead, L.; Palmer, E.O.C.; Lombardero, L.; Rodríguez-Puertas, R.; de Paola, V.; Barnes, S.J.; Sastre, M. Pharmacological Ablation of Astrocytes Reduces A $\beta$  Degradation and Synaptic Connectivity in an Ex Vivo Model of Alzheimer's Disease. *J. Neuroinflamm.* **2021**, *18*, 73. [[CrossRef](#)]
46. Frost, G.R.; Li, Y.M. The Role of Astrocytes in Amyloid Production and Alzheimer's Disease. *Open Biol.* **2017**, *7*, 170228. [[CrossRef](#)]
47. Wyss-Coray, T.; Loike, J.D.; Brionne, T.C.; Lu, E.; Anankov, R.; Yan, F.; Silverstein, S.C.; Husemann, J. Adult Mouse Astrocytes Degrade Amyloid- $\beta$  In Vitro and In Situ. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 453–457. [[CrossRef](#)]

48. Gottfried, C.; Valentim, L.; Salbego, C.; Karl, J.; Wofchuk, S.T.; Rodnigh, R. Regulation of Protein Phosphorylation in Astrocyte Cultures by External Calcium Ions: Specific Effects on the Phosphorylation of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Vimentin and Heat Shock Protein 27 (HSP27). *Brain Res.* **1999**, *833*, 142–149. [[CrossRef](#)]
49. Guerra, M.C.; Tortorelli, L.S.; Galland, F.; Da Ré, C.; Negri, E.; Engelke, D.S.; Rodrigues, L.; Leite, M.C.; Gonçalves, C.A. Lipopolysaccharide Modulates Astrocytic S100B Secretion: A Study in Cerebrospinal Fluid and Astrocyte Cultures from Rats. *J. Neuroinflamm.* **2011**, *8*, 128. [[CrossRef](#)]
50. Selistre, N.G.; Rodrigues, L.; Federhen, B.C.; Gayger-Dias, V.; Taday, J.; Wartchow, K.M.; Gonçalves, C.-A. S100B Secretion in Astrocytes, Unlike C6 Glioma Cells, Is Downregulated by Lactate. *Metabolites* **2023**, *14*, 7. [[CrossRef](#)]
51. Plaschke, K.; Kopitz, J. In Vitro Streptozotocin Model for Modeling Alzheimer-like Changes: Effect on Amyloid Precursor Protein Secretases and Glycogen Synthase Kinase-3. *J. Neural Transm.* **2015**, *122*, 551–557. [[CrossRef](#)]
52. Leite, M.C.; Galland, F.; Brolese, G.; Guerra, M.C.; Bortolotto, J.W.; Freitas, R.; de Almeida, L.M.V.; Gottfried, C.; Gonçalves, C.A. A Simple, Sensitive and Widely Applicable ELISA for S100B: Methodological Features of the Measurement of This Glial Protein. *J. Neurosci. Methods* **2008**, *169*, 93–99. [[CrossRef](#)]
53. Tramontina, F.; Leite, M.C.; Cereser, K.; de Souza, D.F.; Tramontina, A.C.; Nardin, P.; Andrezza, A.C.; Gottfried, C.; Kapczinski, F.; Gonçalves, C.A. Immunoassay for Glial Fibrillary Acidic Protein: Antigen Recognition Is Affected by Its Phosphorylation State. *J. Neurosci. Methods* **2007**, *162*, 282–286. [[CrossRef](#)]
54. Gottfried, C.; Tramontina, F.; Gonçalves, D.; Gonçalves, C.A.; Moriguchi, E.; Dias, R.D.; Wofchuk, S.T.; Souza, D.O. Glutamate Uptake in Cultured Astrocytes Depends on Age: A Study about the Effect of Guanosine and the Sensitivity to Oxidative Stress Induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Mech. Ageing Dev.* **2002**, *123*, 1333–1340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Thomazi, A.P.; Godinho, G.F.R.S.; Rodrigues, J.M.; Schwalm, F.D.; Frizzo, M.E.S.; Moriguchi, E.; Souza, D.O.; Wofchuk, S.T. Ontogenetic Profile of Glutamate Uptake in Brain Structures Slices from Rats: Sensitivity to Guanosine. *Mech. Ageing Dev.* **2004**, *125*, 475–481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Browne, R.W.; Armstrong, D. Reduced Glutathione and Glutathione Disulfide. *Methods Mol. Biol.* **1998**, *108*, 347–352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Minet, R.; Villie, F.; Marcollet, M.; Meynial-Denis, D.; Cynober, L. Measurement of Glutamine Synthetase Activity in Rat Muscle by a Colorimetric Assay. *Clin. Chim. Acta* **1997**, *268*, 121–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Hancock, K.; Tsang, V.C. India Ink Staining of Proteins on Nitrocellulose Paper. *Anal. Biochem.* **1983**, *133*, 157–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Peterson, G.L. A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which Is More Generally Applicable. *Anal. Biochem.* **1977**, *83*, 346–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Carter, S.F.; Herholz, K.; Rosa-Neto, P.; Pellerin, L.; Nordberg, A.; Zimmer, E.R. Astrocyte Biomarkers in Alzheimer’s Disease. *Trends Mol. Med.* **2019**, *25*, 77–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Wang, Y.; Ni, J.; Zhai, L.; Gao, C.; Xie, L.; Zhao, L.; Yin, X. Inhibition of Activated Astrocyte Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Depressive-like Behaviors. *J. Affect. Disord.* **2019**, *242*, 52–59. [[CrossRef](#)]
62. Seminotti, B.; Amaral, A.U.; Grings, M.; Ribeiro, C.A.J.; Leipnitz, G.; Wajner, M. Lipopolysaccharide-Elicited Systemic Inflammation Induces Selective Vulnerability of Cerebral Cortex and Striatum of Developing Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficient (Gcdh<sup>-/-</sup>) Mice to Oxidative Stress. *Neurotox. Res.* **2020**, *38*, 1024–1036. [[CrossRef](#)]
63. Goshi, N.; Morgan, R.K.; Lein, P.J.; Seker, E. A Primary Neural Cell Culture Model to Study Neuron, Astrocyte, and Microglia Interactions in Neuroinflammation. *J. Neuroinflamm.* **2020**, *17*, 155. [[CrossRef](#)]
64. Dourado, N.S.; Souza, C.D.S.; de Almeida, M.M.A.; Bispo da Silva, A.; dos Santos, B.L.; Silva, V.D.A.; De Assis, A.M.; da Silva, J.S.; Souza, D.O.; Costa, M.d.F.D.; et al. Neuroimmunomodulatory and Neuroprotective Effects of the Flavonoid Apigenin in In Vitro Models of Neuroinflammation Associated with Alzheimer’s Disease. *Front. Aging Neurosci.* **2020**, *12*, 119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Oliveira-Junior, M.S.; Pereira, E.P.; de Amorim, V.C.M.; Reis, L.T.C.; do Nascimento, R.P.; da Silva, V.D.A.; Costa, S.L. Lupeol Inhibits LPS-Induced Neuroinflammation in Cerebellar Cultures and Induces Neuroprotection Associated to the Modulation of Astrocyte Response and Expression of Neurotrophic and Inflammatory Factors. *Int. Immunopharmacol.* **2019**, *70*, 302–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Luo, H.; Xiang, Y.; Qu, X.; Liu, H.; Liu, C.; Li, G.; Han, L.; Qin, X. Apelin-13 Suppresses Neuroinflammation against Cognitive Deficit in a Streptozotocin-Induced Rat Model of Alzheimer’s Disease through Activation of BDNF-TrkB Signaling Pathway. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 395. [[CrossRef](#)]
67. Dos Santos, J.P.A.; Vizuete, A.; Hansen, F.; Biasibetti, R.; Gonçalves, C.A. Early and Persistent O-GlcNAc Protein Modification in the Streptozotocin Model of Alzheimer’s Disease. *J. Alzheimer’s Dis.* **2018**, *61*, 237–249. [[CrossRef](#)]
68. Gonçalves, C.A.; Concli Leite, M.; Nardin, P. Biological and Methodological Features of the Measurement of S100B, a Putative Marker of Brain Injury. *Clin. Biochem.* **2008**, *41*, 755–763. [[CrossRef](#)]
69. Sood, A.; Preeti, K.; Fernandes, V.; Khatri, D.K.; Singh, S.B. Glia: A Major Player in Glutamate–GABA Dysregulation-Mediated Neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.* **2021**, *99*, 3148–3189. [[CrossRef](#)]
70. Mawuenyega, K.G.; Sigurdson, W.; Ovod, V.; Munsell, L.; Kasten, T.; Morris, J.C.; Yarasheski, K.E.; Bateman, R.J. Decreased Clearance of CNS  $\beta$ -Amyloid in Alzheimer’s Disease. *Science (80-)* **2010**, *330*, 1774. [[CrossRef](#)]
71. Miners, J.S.; Baig, S.; Palmer, J.; Palmer, L.E.; Kehoe, P.G.; Love, S. A $\beta$ -Degrading Enzymes in Alzheimer’s Disease. *Brain Pathol.* **2008**, *18*, 240–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



72. Ries, M.; Sastre, M. Mechanisms of A $\beta$  Clearance and Degradation by Glial Cells. *Front. Aging Neurosci.* **2016**, *8*, 160. [[CrossRef](#)]
73. Patil, G.V.; Joshi, R.S.; Kazi, R.S.; Kulsange, S.E.; Kulkarni, M.J. A Possible Role of Glycation in the Regulation of Amyloid  $\beta$  Precursor Protein Processing Leading to Amyloid  $\beta$  Accumulation. *Med. Hypotheses* **2020**, *142*, 109799. [[CrossRef](#)]
74. Yamamoto, N.; Ishikuro, R.; Tanida, M.; Suzuki, K.; Ikeda-Matsuo, Y.; Sobue, K. Insulin-Signaling Pathway Regulates the Degradation of Amyloid  $\beta$ -Protein via Astrocytes. *Neuroscience* **2018**, *385*, 227–236. [[CrossRef](#)]
75. Adermark, L.; Lagström, O.; Loftén, A.; Licheri, V.; Havenäng, A.; Loi, E.A.; Stomberg, R.; Söderpalm, B.; Domi, A.; Ericson, M. Astrocytes Modulate Extracellular Neurotransmitter Levels and Excitatory Neurotransmission in Dorsolateral Striatum via Dopamine D2 Receptor Signaling. *Neuropsychopharmacology* **2022**, *47*, 1493–1502. [[CrossRef](#)]
76. Swanson, R.A.; Graham, S.H. Fluorocitrate and Fluoroacetate Effects on Astrocyte Metabolism in Vitro. *Brain Res.* **1994**, *664*, 94–100. [[CrossRef](#)]
77. Paulsen, R.E.; Contestabile, A.; Villani, L.; Fonnum, F. An In Vivo Model for Studying Function of Brain Tissue Temporarily Devoid of Glial Cell Metabolism: The Use of Fluorocitrate. *J. Neurochem.* **1987**, *48*, 1377–1385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Raut, S.; Bhalerao, A.; Powers, M.; Gonzalez, M.; Mancuso, S.; Cucullo, L. Hypometabolism, Alzheimer's Disease, and Possible Therapeutic Targets: An Overview. *Cells* **2023**, *12*, 2019. [[CrossRef](#)]
79. Nikkar, R.; Esmaeili-bandboni, A.; Badrikoochi, M.; Babaei, P. Effects of Inhibiting Astrocytes and BET/BRD4 Chromatin Reader on Spatial Memory and Synaptic Proteins in Rats with Alzheimer's Disease. *Metab. Brain Dis.* **2022**, *37*, 1119–1131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Shang, X.L.; Wang, Q.B.; Liu, X.P.; Yao, X.Q.; Cao, F.Y.; Wang, Q.; Zhang, J.Y.; Wang, J.Z.; Liu, G.P. Fluorocitrate Induced the Alterations of Memory-Related Proteins and Tau Hyperphosphorylation in SD Rats. *Neurosci. Lett.* **2015**, *584*, 230–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Bakaeva, Z.; Lizunova, N.; Tarzhanov, I.; Boyarkin, D.; Petrichuk, S.; Pinelis, V.; Fisenko, A.; Tuzikov, A.; Sharipov, R.; Surin, A. Lipopolysaccharide from *E. Coli* Increases Glutamate-Induced Disturbances of Calcium Homeostasis, the Functional State of Mitochondria, and the Death of Cultured Cortical Neurons. *Front. Mol. Neurosci.* **2022**, *14*, 811171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Wang, Y.S.; White, T.D. The Bacterial Endotoxin Lipopolysaccharide Causes Rapid Inappropriate Excitation in Rat Cortex. *J. Neurochem.* **1999**, *72*, 652–660. [[CrossRef](#)]
83. Vizuete, A.F.K.; Fróes, F.; Seady, M.; Zanutto, C.; Bobermin, L.D.; Roginski, A.C.; Wajner, M.; Quincozes-Santos, A.; Gonçalves, C.A. Early Effects of LPS-Induced Neuroinflammation on the Rat Hippocampal Glycolytic Pathway. *J. Neuroinflamm.* **2022**, *19*, 255. [[CrossRef](#)]
84. Leng, F.; Edison, P. Neuroinflammation and Microglial Activation in Alzheimer Disease: Where Do We Go from Here? *Nat. Rev. Neurol.* **2021**, *17*, 157–172. [[CrossRef](#)]
85. Heneka, M.T.; Carson, M.J.; El Khoury, J.; Landreth, G.E.; Brosseron, F.; Feinstein, D.L.; Jacobs, A.H.; Wyss-Coray, T.; Vitorica, J.; Ransohoff, R.M.; et al. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Lancet Neurol.* **2015**, *14*, 388–405. [[CrossRef](#)]
86. Lee, J.W.; Lee, Y.K.; Yuk, D.Y.; Choi, D.Y.; Ban, S.B.; Oh, K.W.; Hong, J.T. Neuro-Inflammation Induced by Lipopolysaccharide Causes Cognitive Impairment through Enhancement of Beta-Amyloid Generation. *J. Neuroinflamm.* **2008**, *5*, 37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Bhuvanendran, S.; Paudel, Y.N.; Kumari, Y.; Othman, I.; Shaikh, M.F. Embelin Prevents Amyloid-Beta Accumulation via Modulation of SOD1 in a Streptozotocin-Induced AD-like Condition: An Evidence from in Vitro Investigation. *Curr. Res. Neurobiol.* **2022**, *3*, 100032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Bagaméry, F.; Varga, K.; Kecsmár, K.; Vincze, I.; Szökő, É.; Tábi, T. Lack of Insulin Resistance in Response to Streptozotocin Treatment in Neuronal SH-SY5Y Cell Line. *J. Neural Transm.* **2020**, *127*, 71–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Rodrigues, L.; Biasibetti, R.; Swarowsky, A.; Leite, M.; Quincozes-Santos, A.; Achaval, M.; Gonçalves, C.A. Hippocampal Alterations in Rats Submitted to Streptozotocin-Induced Dementia Model: Neuroprotection with Aminoguanidine. *Adv. Alzheimer's Dis.* **2011**, *1*, 215–227. [[CrossRef](#)]
90. Tramontina, A.C.; Wartchow, K.M.; Rodrigues, L.; Biasibetti, R.; Quincozes-Santos, A.; Bobermin, L.; Tramontina, F.; Gonçalves, C.-A. The Neuroprotective Effect of Two Statins: Simvastatin and Pravastatin on a Streptozotocin-Induced Model of Alzheimer's Disease in Rats. *J. Neural Transm.* **2011**, *118*, 1641–1649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

### **3.2. Capítulo II**

*Oral curcumin administration prevents early astrocytic alterations in Alzheimer's disease induced by STZ via PPAR $\gamma$  pathway*

Artigo a ser submetido no periódico The Journal of Nutritional Biochemistry.

#### **4. Discussão**

O diagnóstico das doenças neurodegenerativas, especialmente da DA, costuma ser tardio. No entanto, alterações moleculares podem ser iniciadas ainda nos estágios pré-clínicos, principalmente em células astrocíticas (De Strooper & Karran, 2016). Essas alterações podem estar associadas a vários fatores, não sendo necessariamente específicos da DA (Gonzales et al., 2022). Dado o desafio do diagnóstico precoce e a importância de entender as alterações iniciais na DA, bem como a necessidade de identificar novos alvos terapêuticos, buscamos mimetizar algumas dessas alterações em culturas de astrócitos e buscar potenciais alvos terapêuticos.

##### **4.1. Disfunção de astrócitos em alterações associadas a neurodegeneração**

Buscando avaliar como condições associadas aos estágios iniciais de doenças neurodegenerativas podem afetar as células astrogliais, expusemos culturas primárias de astrócitos a alguns indutores dessas condições, sendo eles o MG para mimetizar condições associadas ao DM, o FC como um inibidor do metabolismo energético, o LPS para induzir neuroinflamação e a STZ por ser amplamente utilizado como indutor de um modelo progressivo de DA em modelos animais.

Inicialmente, utilizamos concentrações crescentes dos 4 compostos para escolher a concentração de uso baseado em proteínas características de astrócitos, GFAP e S100B que estão alteradas nas doenças neurodegenerativas (Donato, 2001; Escartin et al., 2021; Gonçalves et al., 2018). Nossos resultados indicam que essas proteínas são componentes essenciais da resposta astrocítica, uma vez que todos os estímulos testados provocaram respostas similares nos astrócitos, incluindo o aumento dos níveis de GFAP e a redução na secreção de S100B, sem evidência de dano celular.

Trabalhos anteriores mostraram que o MG é capaz de diminuir a secreção de S100B após 1 h de incubação (F. Hansen, Battú, et al., 2016) enquanto que após 6 semanas da injeção ICV de MG esse mesmo parâmetro não foi alterado, assim como o conteúdo de GFAP (F. Hansen,

Pandolfo, et al., 2016) sugerindo que as alterações identificadas aqui podem representar eventos precoces. Em relação ao FC, já existem dados na literatura que mostram que esse composto é capaz de diminuir a captação de S100B de forma aguda, após 1 h de exposição a 100  $\mu$ M, em fatias de hipocampo e cultura de astrócitos (Selistre et al., 2023; Vizuete et al., 2019) e nossos dados mostram que esse efeito persiste por 24 h. Interessantemente, em um modelo de depressão, o FC foi capaz de diminuir os altos níveis de GFAP induzidos por LPS (Yun Wang et al., 2019). Em condições de neuroinflamação induzida por LPS, os mesmos achados destes trabalhos já foram relatos tanto em modelos *in vitro* de astrócitos isolados como *in vivo* (Da Ré et al., 2020; Dourado et al., 2020; Goshi et al., 2020; Guerra et al., 2011; Oliveira-Junior et al., 2019; Rojas et al., 2023; Seady et al., 2023; Seminotti et al., 2020). Na DA, os marcadores de astrócitos também se mostram relevantes, a S100B é amplamente reconhecida como um indicador de dano cerebral (Gonçalves et al., 2008), enquanto a elevação de GFAP no soro foi sugerida como um marcador precoce da doença (Johansson et al., 2023). No modelo *in vivo* de indução de DA por injeção ICV de STZ, alterações em ambas proteínas já foram relatadas, sendo a reatividade astrocítica um componente muito precoce, caracterizada por uma elevação dos níveis de GFAP desde 48 h após a indução do modelo. Da mesma forma, a S100B pode ser observada reduzida a partir de 1 semana *in vivo* e 1 h em fatias de hipocampo (Dos Santos et al., 2018; Leticia Rodrigues et al., 2019). Nossos dados reproduzem esses dados em cultura de astrócitos isolados, reforçando a importância desses marcadores e desse tipo celular na doença.

De forma geral, é essencial considerar o contexto ao interpretar as alterações nos níveis de GFAP e S100B (Escartin et al., 2021; Gonçalves et al., 2008). Aqui, os resultados de MG, FC, LPS e STZ, que replicam condições relacionadas a danos cerebrais, observamos um perfil semelhante, sugerindo a indução de disfunção astrocítica, semelhante ao que é observado em doenças neurodegenerativas. Nossos resultados corroboram a relevância desses marcadores como indicadores da resposta astrocítica nessas doenças.

Os resultados mais expressivos foram encontrados nas concentrações mais altas dos compostos estudados, que foram utilizadas para avaliar parâmetros associados à importante função astrocítica no metabolismo de glutamato, bem como a influência dessas condições no metabolismo amiloide dessas células. A alteração do funcionamento dos mecanismos associados a detoxificação de glutamato contribui com a neurodegeneração, através de mecanismo que podem levar a excitotoxicidade, devido à superestimulação dos receptores desse neurotransmissor pelo seu acúmulo na fenda sináptica (Andersen et al., 2021). Além disso, disfunções desse sistema também estão associados ao aumento do estresse oxidativo, uma vez que a GSH é produzida a partir do glutamato e é um importante mecanismo antioxidante (Y. Chen et al., 2020). Por outro lado, é fundamental destacar o papel ativo dos astrócitos na progressão da DA, onde eles podem participar tanto dos mecanismos de produção de  $\beta$ A quanto de processos essenciais de depuração amiloide (Frost & Li, 2017; Wyss-Coray et al., 2003). Compreender essa função dos astrócitos diante das diversas alterações associadas às doenças neurodegenerativas pode auxiliar no entendimento de fases onde a DA ainda não pode ser devidamente identificada. Em relação à avaliação do metabolismo de glutamato e de  $\beta$ A, diferentemente do que foi observado para as medidas de GFAP e S100B, foram encontrados perfis diferentes de resposta para cada composto avaliado.

Na condição semelhante a DM2 nos astrócitos, induzida por MG, observamos um aumento de GSH e da atividade de GS, sem alterar a captação de glutamato. Alterações no sistema glutamatérgico no DM têm sido associadas a alterações cognitivas frequentemente encontradas na doença (Hristov et al., 2024). Em astrócitos, um trabalho prévio sugeriu um mecanismo astrocítico protetor frente ao MG, através do aumento da atividade da enzima glioxalase 1, associado a um aumento de GSH, ambos necessários para a detoxificação de MG. As reações de glicação também já foram associadas a progressão da DA através de mecanismos que favorecem a formação de  $\beta$ A (Patil et al., 2020). Já foi mostrado que a inibição da via de

sinalização de insulina em astrócitos causa redução das enzimas de degradação de  $\beta$ A, NEP e IDE (Yamamoto et al., 2018). Apesar disso, a indução de glicação por MG em nossas condições não impactaram nos níveis de  $\beta$ A nem de suas enzimas degradadoras.

Na indução do hipometabolismo energético induzido por FC, é possível encontrar na literatura relatos de perturbação do metabolismo de glutamato. Em culturas de astrócitos foi observada a diminuição da captação de glutamato e da síntese de glutamina em tempos entre 30 e 180 min após a exposição a 500  $\mu$ M de FC (Swanson & Graham, 1994), enquanto que 50  $\mu$ M de FC causou um acúmulo de glutamato extracelular acompanhado por diminuição dos níveis de glutamina em 60 min (Adermark et al., 2022). Nesse trabalho os parâmetros de metabolismo de glutamato foram avaliados após 24 h da exposição dos astrócitos a 100  $\mu$ M de FC levando a um aumento na captação de glutamato, seguido por uma diminuição no conteúdo de GSH e sem alterações na atividade da enzima GS. Essa discrepância de dados pode ser explicada pela reversibilidade da ação do FC no metabolismo de glutamato após 24 h (Paulsen et al., 1987). O prejuízo do metabolismo energético é amplamente discutido na DA desde fases iniciais da doença; entretanto, poucos estudos avaliaram se o FC poderia induzir alterações características dessa doença. Em um modelo animal de DA induzido pela injeção de  $\beta$ A<sub>1-42</sub> no hipocampo, descobriu-se que o FC reduz a memória espacial (Nikkar et al., 2022) além de aumentar a fosforilação da tau no hipocampo (Shang et al., 2015). Aqui, a exposição das culturas de astrócitos exclusivamente ao FC, não causou alterações significativas no metabolismo do  $\beta$ A.

Um caráter inflamatório no SNC é extensamente descrito para a grande maioria das doenças neurodegenerativas (Stephenson et al., 2018). Em relação ao metabolismo de glutamato, observamos uma redução da captação desse neurotransmissor pelos astrócitos, sugerindo que nessas condições pode haver um acúmulo de glutamato na fenda sináptica. De fato, em modelos utilizando LPS para induzir neuroinflamação em neurônios, fatias de

hipocampo e córtex, foi relatado um aumento da excitotoxicidade, caracterizada pelo aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, levando a progressão da neurodegeneração (Bakaeva et al., 2022; Vizuite et al., 2022; Y. S. Wang & White, 1999). Neste trabalho, encontramos também um aumento da atividade de GS e nenhuma alteração no conteúdo de GSH. Trabalhos prévios relataram uma diminuição dos níveis de GSH tanto em fatias de hipocampo como em culturas de astrócitos expostos a diferentes concentrações de LPS, de 0,01 a 30  $\mu\text{g/mL}$  entre 6 e 24 h (Guerra et al., 2011; Vizuite et al., 2022). Especificamente na DA, a inflamação já foi extensamente relatada como uma alteração determinante para o desenvolvimento da doença (Heneka et al., 2015; Leng & Edison, 2021). Na amiloidogênese, a neuroinflamação induzida por LPS pode induzir a expressão de APP e BACE1 (J. W. Lee et al., 2008). Aqui mostramos que o LPS também pode estar envolvido no desenvolvimento da DA, prejudicando os mecanismos de depuração  $\beta\text{A}$  dos astrócitos, como observado pela diminuição dos níveis de IDE, mesmo antes do acúmulo de  $\beta\text{A}$ .

Dentre as tantas alterações presentes no desenvolvimento da DA, distúrbios na função glutamatérgica são frequentemente relatados, inclusive alterações nos níveis de glutamato precedem a deposição de  $\beta\text{A}$  (Bukke et al., 2020). No modelo induzido por injeção ICV de STZ o efeito prejudicial desse composto nos níveis de GSH e na atividade de GS já foi extensivamente mostrado em diferentes tempos após a indução do modelo (Biasibetti et al., 2013, 2017; Dos Santos et al., 2018; Rodrigues et al., 2009; Tramontina et al., 2011). Neste trabalho, ao reproduzir esses efeitos na cultura de astrócitos, mostramos pela primeira vez que essas alterações estão diretamente associadas a disfunções dessas células. Além disso, observamos também um aumento da captação de glutamato, medida que em trabalho prévio em modelo animal após 4 semanas, quando os animais já apresentam dano cognitivo, não foi encontrado alterado (A. C. Tramontina et al., 2011). Dessa forma, sugerimos que o aumento de captação de glutamato observado pode estar associado a mecanismos compensatórios nos

estágios iniciais da doença. A STZ, quando administrada ICV *in vivo* induz o acúmulo de  $\beta$ A e trabalhos *in vitro*, já mostraram que ela induz em células neuronais a expressão gênica de APP, MAPT, e das isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  da glicogênio sintase cinase-3 (GSK-3), que são vias associadas com a produção de  $\beta$ A e a fosforilação de tau (Bhuvanendran et al., 2022). Nesse trabalho, observamos que, em astrócitos, a STZ causou a redução dos níveis IDE e NEP associados a um aumento de  $\beta$ A<sub>1-40</sub>, revelando um efeito direto da STZ nessas células, que pode contribuir para o acúmulo de  $\beta$ A.

A avaliação de condições que mimetizaram condições gerais associadas às doenças neurodegenerativas, como altas concentrações de glicose, inibição do metabolismo energético de astrócitos, neuroinflamação e indução de características de desenvolvimento de DA, por MG, FC, LPS e STZ, mostrou que podem afetar os astrócitos, alterando as funções celulares e contribuindo para a progressão de distúrbios cerebrais como a DA.

#### **4.2. Modelo de DA induzido *in vitro* em astrócitos**

Muitos modelos *in vivo* já foram desenvolvidos para se estudar a DA sendo baseados diferentes mecanismos e possibilitando estudos com diferentes abordagens. Por outro lado, os modelos *in vitro*, apesar de permitirem o estudo de características da doença em nível celular e molecular, ainda se mostram bastante limitados.

O modelo da STZ é um dos mais utilizados para induzir o modelo de DA esporádica em animais, entretanto seu mecanismos de ação e a contribuição dos diferentes tipos celulares que levam as alterações relacionadas a esse doença ainda não são completamente entendidos (Grieb, 2016). Além disso, poucos trabalhos utilizaram este indutor em modelos *in vitro*, sendo a maioria em modelos neuronais (Bagaméry et al., 2020; Bhuvanendran et al., 2022; J. Park et al., 2020; Plaschke & Kopitz, 2015).

Neste trabalho, a exposição de culturas de astrócitos à STZ resultou em alterações semelhantes às observadas em modelos *in vivo* de DA, no que se refere a GFAP, S100B, GS e



GSH. Além disso, observou-se uma resposta direta dos astrócitos à STZ no metabolismo amiloide, sugerindo a STZ como um modelo adequado para o estudo das alterações observadas na DA em astrócitos e o efeito de agentes protetores.

A utilização da STZ em modelos *in vitro* de culturas de astrócitos oferece uma plataforma promissora para investigar a DA mais detalhadamente. Essa abordagem não apenas permite a investigação dos mecanismos de ação da STZ e seus efeitos nos astrócitos, mas também contribui significativamente para compreender os mecanismos moleculares por trás das alterações observadas nessas células na DA. O estudo dos astrócitos é particularmente relevante para entender as alterações precoces da doença, dado o papel central dos astrócitos desde as fases iniciais. Além disso, esses estudos podem fornecer informações valiosas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas a essas alterações mais iniciais, possibilitando intervenções mais eficazes.

### **4.3. STZ causa alterações antes do dano cognitivo**

A STZ induz alterações relacionadas à DA em animais ao longo do tempo após a indução do modelo. Essa característica progressiva da STZ a torna um ótimo modelo para se estudar diferentes estágios da doença (Grieb, 2016). Neste trabalho, buscamos entender alterações de estágios iniciais da DA que precedam o dano cognitivo. Para isso, inicialmente buscamos comparar dois tempos de indução do modelo, um tempo curto, 1 semana após a injeção de STZ, pouco explorado na literatura, e um tempo com alterações melhor descritas, 4 semanas.

Embora a STZ injetada via ICV seja um modelo de DA amplamente estudado, a maioria dos trabalhos utiliza tempos relativamente longos de indução, com o objetivo de avaliar alterações melhor estabelecidas da doença, como por exemplo dano cognitivo, acúmulo de  $\beta$ A e hiperfosforilação da tau. Na literatura, o dano cognitivo induzido pela injeção ICV de STZ foi relatado após 2 semanas da cirurgia, avaliado pelo teste de reconhecimento de objetos (RO) (Biasibetti et al., 2017), enquanto que entre o sétimo e o nono dia após a injeção de STZ não

foram observadas alterações de memória através do teste do labirinto aquático de Morris (S. Rai et al., 2014). Neste trabalho observamos que, após uma semana da indução do modelo, os animais do grupo STZ ainda não apresentaram as alterações cognitivas observadas após 4 semanas da indução do modelo. Desta forma, as alterações bioquímicas encontradas nesse período podem estar associadas a um dano primário, que provavelmente está associado a causa do dano cognitivo observado posteriormente.

Algumas das alterações moleculares mais características DA como a hiperfosforilação da tau e o acúmulo de  $\beta$ A só são observados no modelo da STZ a partir de tempos longos após a injeção, acima de 4 semanas (Moreira et al., 2022; Salkovic-Petrisic et al., 2011). Em nosso estudo, tanto a hiperfosforilação da tau quanto os níveis de  $\beta$ A não foram afetados pela STZ após 1 ou 4 semanas da injeção. Entretanto, nós observamos uma diminuição nos níveis de HSP70 após 4 semanas da injeção de STZ. A fosforilação da tau é regulada por diversas vias e alguns trabalhos mostraram que a redução nos níveis da chaperona HSP70 pode estar associada a exacerbação desse fenômeno (Jinwal et al., 2013; Moll et al., 2022). Quanto ao acúmulo de  $\beta$ A, observamos níveis reduzidos das enzimas degradadoras de  $\beta$ A, NEP e IDE, desde os estágios iniciais da indução do modelo. Esses resultados sugerem que as alterações no metabolismo do  $\beta$ A podem preceder o dano cognitivo. Também buscamos avaliar os níveis de TNF- $\alpha$  no hipocampo dos animais, uma vez que a resposta inflamatória é outro componente característico da DA. Na literatura, neste modelo induzido por STZ, alterações de marcadores inflamatórios NF $\kappa$ B, COX-2, TLR4, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  foram relatadas em tempos de 1 a 8 semanas a partir da indução do modelo (Dos Santos et al., 2018; Islam et al., 2015; S. Rai et al., 2013; Rajasekar et al., 2017; Siddiqui et al., 2023). No entanto, nas nossas condições experimentais, observamos um aumento de TNF- $\alpha$  apenas no tempo mais longo, 4 semanas.

Por ser um modelo majoritariamente utilizado *in vivo*, pouco se sabe do efeito direto da STZ nas células do SNC. Entender melhor a resposta de cada tipo celular à STZ pode auxiliar no

estudo dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento inicial da DA. As células gliais são células que desempenham papéis cruciais desde as fases iniciais da DA (De Strooper & Karran, 2016). Este trabalho mostrou uma resposta anterior das células gliais do que dos neurônios, uma vez que a sinaptofisina foi alterada pela STZ somente após 4 semanas da indução do modelo, enquanto a GFAP, proteína relacionada à ativação astrocítica, foi elevada desde 1 semana, evidenciando a ativação dessas células. Surpreendentemente, a concentração da proteína característica de microglia, molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizada 1 (Iba-1), foi reduzida pela STZ após 1 semana e elevada após 4 semanas. Trabalhos anteriores relataram alteração nos níveis de proteínas características dessas células desde tempos muito curtos, a partir de 48 h após a injeção ICV de STZ já é possível observar um aumento da proteína GFAP (Leticia Rodrigues et al., 2019), e após uma semana foi observado um aumento de Iba-1 (Dos Santos et al., 2018).

Uma vez observada uma resposta glial, especialmente astrocítica, prévia aos demais tipos celulares avaliados, e baseado em nosso trabalho anterior sobre os efeitos da STZ em cultura de astrócitos, analisamos funções específicas dessas células. Em 1 semana de indução, ocorreu um aumento de S100B no hipocampo, que poderia indicar uma ativação dessas células. Por outro lado, a indução do modelo causou uma diminuição de S100B no líquido cefalorraquidiano (LCR), bem como nos níveis de RAGE, seu receptor, o que pode indicar uma perda da função protetora dessas células, uma vez que esta proteína secretada pode desempenhar papel neurotrófico (Donato, 2001). Esses dados corroboram estudos anteriores, que mostraram que alterações no conteúdo intracelular e na secreção de S100B não são dependentes entre si (Gonçalves et al., 2008; Letícia Rodrigues et al., 2009). É importante ressaltar que, exceto pelo RAGE, essas alterações persistem até 4 semanas, onde os animais já apresentam dano cognitivo. A importância das células gliais neste modelo de DA também pôde ser evidenciada pelas alterações observadas no metabolismo do glutamato nos animais do grupo STZ em ambos os

tempos de indução do modelo. Neste trabalho foi observado que a captação de glutamato é diminuída pela administração de STZ em 4 semanas, mas não em 1, enquanto que a atividade da enzima GS, bem como o conteúdo de GSH já estão diminuídas desde 1 semana após a indução com STZ, indicando estas serem alterações mais precoces neste modelo.

Ainda, buscando caracterizar as alterações que precedem o dano cognitivo do modelo de DA induzido por STZ, avaliamos alguns parâmetros associados ao metabolismo energético, que também é uma alteração precoce em paciente com DA (Raut et al., 2023). Surpreendentemente, nosso modelo mostrou um aumento dos transportadores de glicose de forma precoce em neurônios (GLUT3). Entretanto, a captação de glicose hipocampal só se mostrou aumentada mais tardiamente, em 4 semanas. O GLUT1 (expresso principalmente em astrócitos) não foi alterado pela exposição à STZ. Em um trabalho prévio, foi mostrado que após 2 semanas da cirurgia não há alteração na captação de glicose, porém, diferente do que encontramos, o mesmo trabalho mostrou uma diminuição neste parâmetro após 4 semanas (Biasibetti et al., 2013). Além disso, encontramos um aumento na fosforilação da Ser 307 do substrato 1 do receptor de insulina (IRS1) a partir de 1 semana após a injeção de STZ, indicando um mecanismo de resistência à insulina, já proposto na literatura (Aguirre et al., 2002). Outro substrato energético importante para o cérebro é o lactato, que pode ser um produto da glicose nas células cerebrais (Gonçalves et al., 2018). Apesar de terem sido observadas alterações nos níveis de lactato em pacientes com DA, os achados a respeito são contraditórios (Raut et al., 2023). Neste trabalho, nós encontramos apenas uma diminuição transitória nos níveis de lactato no LCR que pode estar relacionada tanto a uma redução de sua liberação pelos astrócitos quanto a um aumento de sua captação neuronal.

Alterações inespecíficas associadas as fases iniciais do desenvolvimento da DA como inflamação, hipometabolismo energético e estresse oxidativo são alterações que podem ter seus mecanismos regulados pela via do PPAR $\gamma$ . Disfunções dessa via já foram relatadas em estudos

sobre a DA, mas no modelo da STZ ainda são pouco exploradas. Já foi mostrado que a STZ administrada via IP, em um modelo de DM, causa a redução dos níveis de PPAR $\gamma$  (L. P. Liu et al., 2013). Além disso, a ativação do PPAR $\gamma$  preveniu os efeitos da STZ 14 dias após a administração (Birdavinder Singh et al., 2013). Nesse trabalho, mostramos uma redução precoce e persistente dos níveis de PPAR $\gamma$ , sugerindo que a desregulação dessa via pode estar associada aos mecanismos que levam às alterações associadas a DA. Também observamos uma redução em curto prazo do coativador do PPAR $\gamma$ , coativador gama 1-alfa do receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma (PGC-1 $\alpha$ ), reforçando uma possível desregulação na ativação dessa via de forma precoce. Uma desregulação na interação entre PPAR $\gamma$  e PGC-1 $\alpha$  tem sido sugerida na DA como uma das causas do aumento dos níveis de  $\beta$ A (Katsouri et al., 2011), disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (St-Pierre et al., 2006), aumento da sinalização inflamatória (Sastre et al., 2006) e hipometabolismo da glicose (Qin et al., 2009).

Para entender um pouco mais dos efeitos da desregulação do PPAR $\gamma$  no modelo, buscamos avaliar alguns parâmetros associados a mecanismos neuroprotetores, de metabolismo energético e de resposta inflamatória regulados por essa via, como o peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1), a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e o NF $\kappa$ B, todos já mostrados alterados na DA. O prejuízo na via do PPAR $\gamma$  pode também afetar a expressão de GLP-1, que atua na secreção de fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o fator de crescimento nervoso (NGF) (Salcedo et al., 2012). Neste trabalho, a administração ICV de STZ causou uma redução precoce e persistente de GLP-1. A AMPK, importante na manutenção da homeostase energética celular, apresenta uma regulação recíproca com a via do PPAR $\gamma$  (S. G. Kim & Lee, 2010). Aqui, nós observamos que, após o curto tempo da injeção de STZ, a fosforilação da AMPK foi reduzida, indicando uma diminuição da sua ativação. Além disso, sabe-se que o papel anti-inflamatório do PPAR $\gamma$  ocorre pela inibição da atividade do NF $\kappa$ B. Nesse trabalho, foi observada uma diminuição dos níveis de NF $\kappa$ B após 1

semana da injeção de STZ, que pode estar associada também diminuição dos níveis de Iba-1 observados, tendo em vista a importância das células microgлияis para a resposta inflamatória. Dessa forma, observamos perfil semelhante de redução dos níveis de PPAR $\gamma$ , PGC-1 $\alpha$ , GLP-1 e fosforilação da AMPK no curto período de STZ estudado, sugerindo fortemente que essa via está envolvida com as alterações precoces da DA e que possivelmente está associada ao surgimento do dano cognitivo.

#### **4.4. Curcumina previne alterações iniciais da DA em modelo *in vivo* induzido por STZ**

A curcumina é um composto bioativo que tem ação em múltiplos alvos. Sua capacidade de atravessar a BHE somada aos seus efeitos contra a amiloidogênese, inflamação e processos oxidativos, tornam esta molécula interessante para estudo de disfunções cerebrais (M. Chen et al., 2018; Maiti & Dunbar, 2018; H. Yang et al., 2022). Dado que a desregulação da via do PPAR $\gamma$  está envolvida nos mecanismos iniciais do desenvolvimento da DA, a indução farmacológica dessa via emerge como uma estratégia protetora promissora. Aliado a isso, já foi mostrado que, embora não exclusivamente, o PPAR $\gamma$  é um importante alvo molecular da curcumina, direcionando o foco do presente trabalho a investigar como e quais efeitos protetores da curcumina podem estar associados a esse alvo.

Neste trabalho, observamos que a maior parte dos efeitos protetores da curcumina ocorreram 1 semana após a indução do modelo, o menor tempo testado. Apesar da baixa biodisponibilidade oral deste composto, dados da literatura mostram que a curcumina administrada oralmente é capaz de atingir rapidamente o cérebro, após 3 h (Sorrenti et al., 2018). Dessa forma, esses resultados podem indicar tanto um efeito nos estágios mais precoces da doença, quanto a necessidade da manutenção de seus níveis plasmáticos para a manutenção de alguns de seus efeitos, uma vez que em 4 semanas a administração de curcumina já tinha sido interrompida.

Nosso tratamento com curcumina preveniu a perda de memória de curto prazo, mas não a de longo prazo observada 4 semanas após a indução do modelo. De fato, um efeito da curcumina em modelos experimentais de DA é o de retardar o dano cognitivo (da Costa et al., 2018), mas a maioria dos estudos utiliza a curcumina por períodos mais longos (de 21 a 90 dias) e por tempo integral até as análises (Agrawal et al., 2010; Bassani et al., 2017; Ishrat et al., 2009; Koo et al., 2018; Samy et al., 2016; Zheng et al., 2017), explorando pouco seus efeitos prévios ao dano cognitivo. Aqui, pudemos avaliar após 1 semana da indução do modelo de DA as alterações que antecedem o dano cognitivo e que, portanto, podem ter uma relação causal com ele, bem como os efeitos protetores da curcumina.

Apesar das alterações moleculares mais estudadas da DA, hiperfosforilação da tau e o acúmulo de  $\beta$ A, serem tardias, nós observamos que a curcumina foi capaz de reduzi-las a níveis inferiores ao basal em 1 semana após a injeção de STZ. A curcumina tem, de fato, se destacado em estudos da DA por seus efeitos diretos na prevenção e proteção da progressão de alterações características da doença, prevenindo a formação dos ENF pela inibição da fosforilação e agregação da tau (Rane et al., 2017; Tang et al., 2017), através da inibição da ativação da GSK-3 $\beta$  (Sun et al., 2017). Por outro lado, um dos efeitos mais proeminentes da curcumina é o efeito anti-amiloidogênico na prevenção do acúmulo de  $\beta$ A, através de mecanismos que suprimem a sua produção e que induzem vias de degradação (Martin et al., 2019; Orjuela et al., 2021; Reinke & Gestwicki, 2007; Yoshida et al., 2011; M. J. Zhang et al., 2023).

O ponto chave para o acúmulo de  $\beta$ A é o desbalanço entre a sua produção e a eliminação (Masters et al., 2015b), inclusive já foi mostrado que o comprometimento da depuração de  $\beta$ A é crucial para o início do desenvolvimento da doença (Mawuenyega et al., 2010; Wyss-Coray et al., 2003). A curcumina, nesse ponto, desperta uma atenção especial, uma vez que tem mostrado promover a eliminação de  $\beta$ A aumentando a fagocitose desse peptídeo por microglias e macrófagos (Ferreira et al., 2016; Laura Zhang et al., 2006), além de induzir a degradação

proteolítica (P. T. Chen et al., 2016). Aqui, mostramos a modulação inicial da curcumina na degradação de  $\beta$ A, evitando a redução de NEP induzida por STZ, mas não por IDE no hipocampo. A literatura sobre o efeito da curcumina na NEP é pequena e controversa, um estudo em células SK-N-SH mostrou que 5  $\mu$ M de curcumina pode melhorar a atividade da NEP (Ayoub & Melzig, 2008), mas outro em células SH-SY5Y mostrou que 5  $\mu$ M a curcumina não afetou a atividade da NEP, os níveis de mRNA ou os níveis de proteína, apesar de alguns poli-hidroxicurcuminóides terem feito (P. T. Chen et al., 2016). Contudo é relevante notar que ambos os estudos foram conduzidos em linhagens celulares neuronais. Além disso, em modelos de obesidade, descobriu-se que a curcumina regulou positivamente a expressão hepática de IDE (Kim et al., 2019; S. J. Lee et al., 2022). Os mecanismos de regulação das vias enzimáticas de degradação amiloide ainda não são completamente compreendidos. Entretanto, alguns estudos utilizando agonistas de PPAR $\gamma$  já mostraram que essa via pode estar envolvida (Alawi et al., 2020; Di Donfrancesco et al., 2023; Espuny-Camacho et al., 2010; Quan, Qian, Li, & Li, 2019; Wei et al., 2014; S. Yang et al., 2017). Porém, ainda é preciso determinar a relação entre a ação da curcumina no PPAR $\gamma$  e a sua ação no *clearance* amiloide.

Neste estudo também observamos que alguns dos efeitos da curcumina que ocorreram no curto prazo persistiram até o tempo mais longo analisado, mesmo com a suspensão da administração de curcumina. Curiosamente, muitos desses efeitos persistentes foram observados para importantes marcadores da função dos astrócitos, corroborando os efeitos da curcumina já relatados na literatura no que diz respeito a alterações morfológicas em células gliais, efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e moduladores da expressão de fatores neurotróficos (Eghbaliferiz et al., 2020; Mohammadi et al., 2022; Seady et al., 2023; F. Ullah et al., 2022). Embora o dano neuronal tenha sido considerado por muito tempo como mecanismo chave no desenvolvimento da DA, nos últimos anos o papel determinante das células gliais na DA tenha sido reconhecido (Blanco-Suárez et al., 2017; Chung et al., 2015).



Aqui, mostramos a importância dessas células no início da indução dos danos causados pelo modelo da STZ, bem como os efeitos protetores da curcumina prevenindo a elevação da GFAP e S100B do hipocampo, além da redução de S100B no LCR. Observamos diferentes efeitos da curcumina sobre a S100B no LCR. Após 1 semana da indução do modelo, observamos uma redução na concentração de S100B maior do que a observada no grupo STZ, mas após 4 semanas, o tratamento com curcumina evitou a redução de S100B observada no grupo STZ. Uma diminuição da secreção de S100B em cultura de astrócitos em condições basais tratados com curcumina já foi relatada em um trabalho anterior do nosso grupo (Seady et al., 2023). Além disso, a curcumina também mostrou efeito a longo prazo na prevenção da diminuição da captação de glutamato causada pela injeção de STZ após 4 semanas da cirurgia, reforçando ainda mais o efeito da curcumina na promoção da função astrocítica. Já foi proposto um efeito da curcumina no metabolismo do glutamato, associado uma capacidade de regular o transporte de glutamato além de modular seus receptores (K. Chen et al., 2015; R. Wang et al., 2008). Esses dados evidenciam os astrócitos como possíveis alvos na busca de estratégias preventivas e tratamentos precoces da DA.

A curcumina se destaca por seus efeitos antioxidantes. Em modelos de DA, onde o estresse oxidativo é um componente que favorece a progressão da doença, a curcumina já foi associada à neutralização de radicais livres, como quelante de íons metálicos e também na ativação da via do fator nuclear E2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), que leva à indução da expressão de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) (J. Y. Park et al., 2021; Shao et al., 2023; Silvestro et al., 2021). Neste trabalho, apesar de alterações nos mecanismos associados ao estresse oxidativo não terem sido extensamente explorados no modelo da STZ, a curcumina foi capaz de prevenir a diminuição dos níveis de GSH induzidos pela STZ após 1 semana da injeção. Já foi mostrado que os efeitos antioxidantes da curcumina também passam pelo aumento da produção de GSH, através da indução das

enzimas glutamato-cisteína ligase, GPx e glutathione redutase (GR), bem como pela redução da GSSG (Ishrat et al., 2009; Lavoie et al., 2009).

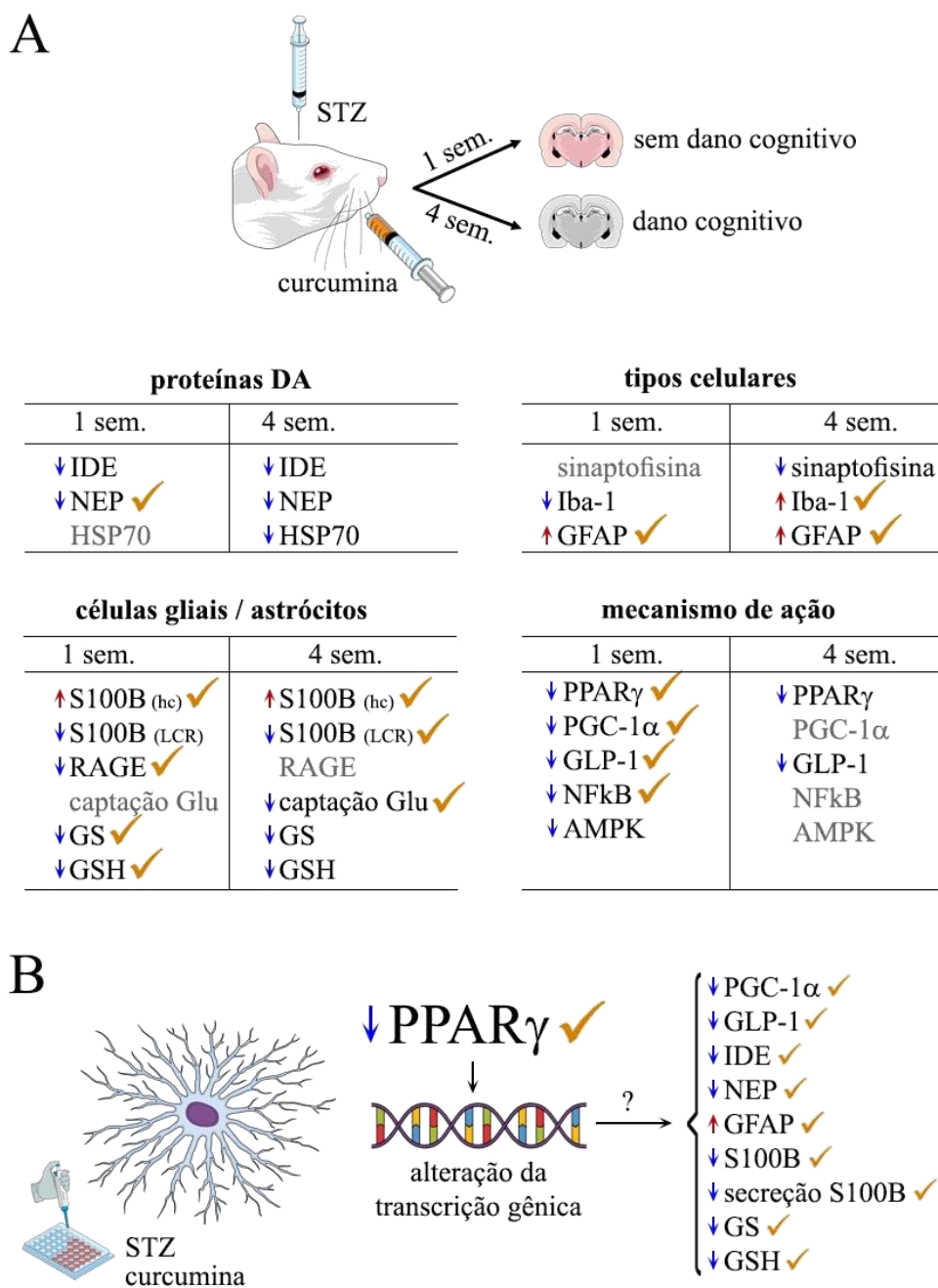
Outro efeito da curcumina, no curto prazo de indução do modelo de DA, foi no metabolismo energético. A administração oral de curcumina evitou o aumento da fosforilação da serina 307 do IRS1 causada pela STZ, corroborando dados que mostram sua ação na melhora da sinalização da insulina no hipocampo em um modelo transgênico da DA, regulando positivamente a via fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) / serina-treonina quinase (AKT) (Feng et al., 2016; P. Wang et al., 2017). Em nosso modelo experimental, mostramos que a curcumina não foi capaz de reverter o aumento da concentração do GLUT3 induzido por STZ, mas interessantemente aumentou a concentração de GLUT1 de forma precoce e persistente. A elevação da captação de glicose causada pela STZ em 4 semanas foi prevenida pela curcumina, mostrando, portanto, efeito sobre o metabolismo energético. É importante mencionar que parte da melhora da memória atribuída ao tratamento com curcumina em modelos de DA tem sido associada à sua ação em vias envolvidas no metabolismo energético cerebral (Feng et al., 2016; Lamichhane et al., 2024; P. Wang et al., 2017).

A DA é extensamente caracterizada na literatura como uma doença neuroinflamatória. Apesar disso, em nosso estudo, não foi observada uma alteração expressiva de marcadores associados à resposta inflamatória. Mesmo assim, a curcumina impediu o aumento de Iba-1 observado no grupo STZ e diminuiu o NFκB em comparação aos grupos STZ e Sham, após 4 semanas de injeção de STZ, mostrando-se mais importante nas fases mais avançadas. Por outro lado, a curcumina não evitou o aumento do TNF-α observado no grupo STZ. Os mecanismos dos efeitos anti-inflamatórios da curcumina têm sido atribuídos à sua ação em múltiplos alvos através da inibição da sinalização TLR4/NFκB (M. Chen et al., 2018; Ni et al., 2015; J. Zhang et al., 2019), regulação negativa da expressão de citocinas, como COX-2, óxido nítrico sintase induzível (iNOS), TNF-α, IL-1, -2, -6, -8 e -12 (Bharti et al., 2003; Erfen & Akbay Çetin, 2022;

Seady et al., 2023; Shao et al., 2023), bem como da inibição da ativação de MAPK (Shao et al., 2023).

Muitos efeitos observado em estudos usando a curcumina como tratamento mostraram seus efeitos na via do PPAR $\gamma$ , tanto por seus efeitos na ativação da via, como pela suspensão de parte dos seus efeitos benéficos pela concomitante supressão do PPAR $\gamma$  (Z. J. Liu et al., 2014; Rinwa et al., 2010; H. M. Wang et al., 2010). Aqui observamos que a redução da concentração de PPAR $\gamma$  induzido pela injeção de STZ foi prevenida pela curcumina após uma semana da indução do modelo, bem como a redução da concentração de outras proteínas participantes da via do PPAR $\gamma$ , como o PGC-1 $\alpha$  e o GLP-1. Além disso, já foi mostrado que a curcumina pode agir nessa via por ligação direta ao PPAR $\gamma$  (Z. J. Liu et al., 2016). Entretanto, a curcumina não foi capaz de prevenir a redução da fosforilação de AMPK após 1 semana, enquanto levou a uma diminuição dos níveis de NF $\kappa$ B a longo prazo, em 4 semanas. Esses achados são importantes e podem ajudar a entender como os múltiplos efeitos da curcumina no metabolismo energético, na biogênese mitocondrial, na ação antioxidante e na resposta anti-inflamatória são coordenados, pelo menos em parte, pela sinalização do PPAR $\gamma$ , principalmente no início do desenvolvimento da DA.

Em conjunto, esses dados mostraram que a curcumina tem um potencial preventivo de alterações associadas ao início do desenvolvimento da DA com destaque à sua modulação da via do PPAR $\gamma$  e outras vias associadas, bem como na modulação da função dos astrócitos, células também reconhecidas pela participação nas fases iniciais da doença (Figura 4).



**Figura 4. Figura integrativa.** (A) Comparação dos efeitos protetores da administração oral da curcumina após 1 e 4 semanas da injeção de STZ via ICV na cognição, nos níveis de proteínas envolvidas na DA, nas células neurais, nas funções glias e nos mecanismos de ação de diferentes moléculas sinalizadoras em ratos. (B) Efeitos preventivos da curcumina em astrócitos expostos a STZ que são modulados via PPAR $\gamma$ . ↑ indica aumento de níveis induzido pela STZ; ↓ indica diminuição de níveis induzido pela STZ; ✓ indica prevenção pela curcumina.

#### 4.5. Curcumina atua na via do PPAR $\gamma$ em astrócitos

Considerando nossos achados até aqui, decidimos investigar melhor a importância da via do PPAR $\gamma$  em astrócitos nas alterações encontradas *in vivo*, utilizando um modelo *in vitro* de

DA, induzido por STZ. Os parâmetros para avaliar a via do PPAR $\gamma$  nas células astrogliais foram selecionados, com base no perfil observado para o PPAR $\gamma$  após 1 semana da indução do modelo de DA *in vivo*, ou seja, aqueles onde se observou uma alteração causada pela STZ que foi prevenida pelo tratamento com curcumina. É importante mencionar que nenhum dos grupos foi capaz de alterar a viabilidade celular quando avaliados pelas técnicas de redução de MTT e incorporação de vermelho neutro, nem de comprometer a integridade celular quando avaliada a atividade extracelular de LDH.

A maioria dos resultados observados no modelo *in vivo* após a injeção de STZ e o tratamento com curcumina foram replicados nos astrócitos cultivados, reforçando mais uma vez o papel importante dessas células no início do desenvolvimento da DA e a STZ como um indutor de características da DA *in vitro*. No entanto, a secreção de S100B apresentou um perfil semelhante ao do S100B no LCR observado após 4 semanas, prevenindo a redução causada pelo STZ.

As três isoformas conhecidas de PPAR podem ser encontradas no cérebro, diferentemente distribuídas de acordo com a região e os tipos celulares (Heneka & Landreth, 2007; Warden et al., 2016). Foi sugerido que as células da glia, especialmente os astrócitos, apresentam níveis mais elevados de PPAR $\gamma$  em comparação com outros tipos celulares do SNC (Cristiano et al., 2001; Cullingford et al., 1998). A STZ foi capaz de reduzir a concentração de PPAR $\gamma$  nos astrócitos e os tratamentos com curcumina ou pioglitazona preveniram essa alteração. Esse efeito da curcumina no PPAR $\gamma$  ainda foi confirmado pela supressão do seu efeito ao se adicionar o inibidor da via, GW9662, ao meio de incubação. O mesmo perfil de resultados foi observado para os níveis de PGC-1 $\alpha$  e GLP-1. Esses resultados evidenciam ainda mais a importância da via do PPAR $\gamma$  nos astrócitos e reforçam essa via como alvo molecular associado aos efeitos protetores da curcumina. De fato já foi mostrada uma ação protetora da sinalização de PPAR $\gamma$

em diversas doenças associadas a distúrbios cerebrais (Diab et al., 2002; Hong et al., 2012; Mandrekar-Colucci et al., 2013; Storer et al., 2005).

Como já mostramos no modelo *in vivo*, as fases precoces da DA estão possivelmente associadas a alterações diretas nas funções astrocíticas. Aqui, após a exposição dos astrócitos a STZ foram reproduzidos o aumento nos níveis de GFAP, a diminuição no conteúdo e na secreção de S100B, bem como a redução da atividade da GS e do conteúdo de GSH, replicando os resultados encontrados anteriormente e, portanto, evidenciando o papel dos astrócitos nesses parâmetros. A curcumina e a pioglitazona preveniram todas as alterações induzidas pela STZ, indicando um envolvimento do PPAR $\gamma$ , embora o GW9662 tenha abolido apenas os efeitos da curcumina no conteúdo de S100B e na atividade de GS.

Alguns estudos mostraram que a ativação do PPAR $\gamma$  poderia atenuar a ativação de astrócitos (Bernardo & Minghetti, 2007; Diab et al., 2002; Griggs et al., 2015; Hong et al., 2012; Storer et al., 2005) e uma regulação da expressão de GFAP por essa via foi sugerida, através da fosforilação do PPAR $\gamma$  por ação da CDK5 (A. Rai et al., 2014). Além disso, foi mostrado que a S100B teve suas concentrações intra e extracelulares diminuídas pela inibição da via do PPAR $\gamma$  com o inibidor GW9662 (Esposito et al., 2014). Quanto ao metabolismo de glutamato, alguns agonistas de PPAR $\gamma$  foram capazes de estimular a expressão dos transportadores de glutamato glial do tipo 1 (GLT1) (Romera et al., 2007). Pouco se sabe sobre os mecanismos de regulação das funções dos astrócitos pela sinalização de PPAR $\gamma$ , entretanto é possível sugerir a ação dessa via na regulação da expressão de GFAP e nos níveis de S100B, bem como no metabolismo do glutamato.

Em relação a sinalização do PPAR $\gamma$  nos astrócitos nas alterações associadas a DA, mais estudos já foram realizados, mostrando que a ativação dessa via previne o acúmulo e a toxicidade de  $\beta$ A e reduz a resposta inflamatória, levando a uma melhora da cognição (Benito et al., 2012; Garcia-Baos et al., 2023; Mandrekar-Colucci et al., 2012; Valles et al., 2010; H.

M. Wang et al., 2010). Assim como em nosso modelo *in vitro* anterior, observamos que a STZ causou uma redução dos níveis das enzimas de degradação do peptídeo  $\beta$ A. Extensas evidências mostram que os agonistas do PPAR $\gamma$  regulam positivamente a expressão das enzimas degradadoras de  $\beta$ A em diferentes tecidos (Alawi et al., 2020; Di Donfrancesco et al., 2023; Escribano et al., 2010; Espuny-Camacho et al., 2010; J. Kim et al., 2017; Quan, Qian, Li, & Li, 2019; Quan, Qian, Li, Li, et al., 2019; Wei et al., 2014; S. Yang et al., 2017). Aqui mostramos que a ativação dessa via nos astrócitos pela ação do seu agonista pioglitazona é capaz de prevenir o efeito da STZ nas duas proteases, evidenciando a regulação dessas enzimas via sinalização do PPAR $\gamma$  nos astrócitos. Também foi observado um papel protetor da curcumina através da indução de mecanismos de degradação amiloide prevenindo a alteração causada pela STZ. Esse efeito preventivo da curcumina na redução dos níveis de IDE parece depender da sinalização de PPAR $\gamma$ , uma vez que foi abolido pela ação do inibidor do GW9662. Interessantemente, no modelo *in vivo*, a redução do conteúdo hipocampal de IDE causada pela injeção de STZ não foi prevenida pelo tratamento com curcumina. Isso poderia ser explicado por um efeito mais seletivo da curcumina em astrócitos quando comparado a outros tipos celulares, não sendo possível, portanto, observar esse efeito de reversão *in vivo*. Entretanto, para verificar essa hipótese, mais estudos precisam ser realizados. Por outro lado, embora a curcumina também previna a redução da NEP induzida pela STZ, o inibidor do PPAR $\gamma$ , GW9662, incubado com curcumina e STZ causou um aumento nos níveis de NEP. O GW9662, atua por ligação direta ao PPAR $\gamma$  de forma irreversível, bloqueando a ligação de seus ativadores (Leesnitzer et al., 2002). Entretanto, nosso trabalho sugere que, em alguns casos, esse composto pode não inibir completamente os efeitos de agonistas do PPAR $\gamma$ . Trabalhos prévios também mostraram que o GW9662 não foi capaz de inibir os efeitos de um agonista PPAR $\gamma$  (Chaffer et al., 2006), bem como ainda potencializou a ação de outro (Seargent et al., 2004). Contudo, nossos achados corroboram a importância da sinalização do PPAR $\gamma$  nos astrócitos para modular

alterações associadas à DA, evidenciando também a ação da curcumina nessas células para a prevenção do acúmulo de  $\beta$ A.

Em suma, os resultados obtidos neste estudo destacam a relevância da via do PPAR $\gamma$  nos astrócitos como um alvo terapêutico promissor para modular as alterações associadas à DA (Figura 4). Ao investigar os efeitos da curcumina comparativamente aos de um agonista conhecido na literatura do PPAR $\gamma$ , a pioglitazona, em culturas de astrócitos expostas à STZ, observamos uma série de respostas importantes, incluindo a prevenção do acúmulo de  $\beta$ A e a redução da resposta inflamatória, que poderiam estar relacionados a uma melhora na cognição. Além disso, constatamos que a ativação da via do PPAR $\gamma$  influencia diretamente a expressão das enzimas de degradação do  $\beta$ A, NEP e IDE, com efeitos protetores observados tanto para a pioglitazona quanto para a curcumina. Esses achados fornecem *insights* valiosos sobre os mecanismos subjacentes aos efeitos neuroprotetores da curcumina e reforçam a importância do PPAR $\gamma$  como um mediador chave na regulação das respostas astrocíticas na DA.

## 5. Conclusão

A partir dos resultados desse trabalho reforçamos a importância da STZ como modelo de estudo das fases iniciais e da progressão da doença de Alzheimer e propomos o uso dessa molécula como um modelo de DA *in vitro*. Evidenciamos também a importância das alterações em astrócitos nas fases iniciais da DA, bem como o papel protetor da curcumina nessa fase da doença por um mecanismo que envolve, ao menos em parte, a regulação de PPAR $\gamma$ . Baseado em nossos dados, podemos concluir que a curcumina é uma molécula com potencial para estratégias preventivas e para o desenvolvimento de novos fármacos baseados em sua estrutura para o tratamento da DA.



## **6. Perspectivas futuras**

Explorar o modelo *in vitro* de DA quanto a alterações clássicas do modelo *in vivo*, como metabolismo energético e resposta inflamatória nos astrócitos;

Fazer um grupo *in vivo* com o inibidor de PPAR $\gamma$ , GW9662, e curcumina para investigar a influência dessa via nos parâmetros avaliados;

Manter o tratamento com curcumina até as 4 semanas para avaliar os parâmetros que foram alterados apenas no tempo de 1 semana após a administração de STZ.

Avaliar possíveis efeitos tróficos da curcumina através de medidas de parâmetros como BDNF, marcadores anti-inflamatórios, em especial a IL-10;

Investigar a translocação nuclear do PPAR $\gamma$  nos astrócitos através de imunocitoquímica;

Avaliar os efeitos da curcumina em um modelo *in vitro* de microglia.

## **7. Apoio financeiro**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), bem como da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCTEN).

## 8. Referências bibliográficas

- Adermark, L., Lagström, O., Loftén, A., Licheri, V., Havenäng, A., Loi, E. A., Stomberg, R., Söderpalm, B., Domi, A., Ericson, M., Clarke, D. D., Nicklas, W. J., Berl, S., Fonnum, F., Johnsen, A., Hassel, B., Hayakawa, K., Nakano, T., Irie, K., ... Gonçalves, C. A. (2022). Fluorocitrate induced the alterations of memory-related proteins and tau hyperphosphorylation in SD rats. *Neurochemical Research*, 584(4), 1377–1385. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199709\)21:1<106::AID-GLIA12>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199709)21:1<106::AID-GLIA12>3.0.CO;2-W)
- Agarwal, S., Yadav, A., & Chaturvedi, R. K. (2017). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) as therapeutic target in neurodegenerative disorders. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(4), 1166–1177. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.043>
- Agrawal, R., Mishra, B., Tyagi, E., Nath, C., & Shukla, R. (2010). Effect of curcumin on brain insulin receptors and memory functions in STZ (ICV) induced dementia model of rat. *Pharmacological Research*, 61(3), 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.12.008>
- Aguirre-Rueda, D., Guerra-Ojeda, S., Aldasoro, M., Iradi, A., Obrador, E., Ortega, A., Mauricio, M. D., Vila, J. M., & Valles, S. L. (2015). Astrocytes protect neurons from A $\beta$ 1-42 peptide-induced neurotoxicity increasing TFAM and PGC-1 and decreasing PPAR- $\gamma$  and SIRT-1. *International Journal of Medical Sciences*, 12(1), 48–56. <https://doi.org/10.7150/ijms.10035>
- Aguirre, V., Werner, E. D., Giraud, J., Lee, Y. H., Shoelson, S. E., & White, M. F. (2002). Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *Journal of Biological Chemistry*, 277(2), 1531–1537. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101521200>
- Akhtar, A., Gupta, S. M., Dwivedi, S., Kumar, D., Shaikh, M. F., & Negi, A. (2022). Preclinical Models for Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future Approaches. *ACS Omega*, 7(51), 47504–47517. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05609>
- Alawi, L. F., Emberesh, S. E., Owuor, B. A., Chodavarapu, H., Fadnavis, R., El-Amouri, S. S., & Elased, K. M. (2020). Effect of hyperglycemia and rosiglitazone on renal and urinary neprilysin in db/db diabetic mice. *Physiological Reports*, 8(3), 1–13. <https://doi.org/10.14814/phy2.14364>
- Alhazmi, H. A., & Albratty, M. (2022). An update on the novel and approved drugs for Alzheimer disease. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 30(12), 1755–1764. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2022.10.004>
- Allaman, I., Bélanger, M., & Magistretti, P. J. (2015). Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. *Frontiers in Neuroscience*, 9(FEB), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00023>
- Alli-Oluwafuyi, A.-M., Luis, P. B., Nakashima, F., Giménez-Bastida, J. A., Presley, S. H., Duvernay, M. T., Iwalewa, E. O., & Schneider, C. (2019). Curcumin induces secretion of glucagon-like peptide-1 through an oxidation-dependent mechanism. *Biochimie*, 165(2), 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.08.013>
- Alonso, A. D., Cohen, L. S., Corbo, C., Morozova, V., ElDrissi, A., Phillips, G., & Kleiman, F. E. (2018). Hyperphosphorylation of Tau Associates with changes in its function beyond microtubule stability. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(October), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00338>
- Anand, R., Gill, K. D., & Mahdi, A. A. (2014). Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*, 76(PART A), 27–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.004>
- Andersen, J. V., Markussen, K. H., Jakobsen, E., Schousboe, A., Waagepetersen, H. S., Rosenberg, P. A., & Aldana, B. I. (2021). Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. *Neuropharmacology*, 196(April), 108719. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108719>

- Andrade-Guerrero, J., Santiago-Balmaseda, A., Jeronimo-Aguilar, P., Vargas-Rodríguez, I., Cadena-Suárez, A. R., Sánchez-Garibay, C., Pozo-Molina, G., Méndez-Catalá, C. F., Cardenas-Aguayo, M.-C., Diaz-Cintra, S., Pacheco-Herrero, M., Luna-Muñoz, J., & Soto-Rojas, L. O. (2023). Alzheimer's Disease: An Updated Overview of Its Genetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3754. <https://doi.org/10.3390/ijms24043754>
- Angeloni, C., Zambonin, L., & Hrelia, S. (2014). Role of methylglyoxal in alzheimer's disease. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/238485>
- Anoush, M., Bijani, S., Moslemifar, F., Jahanpour, F., Kalantari-Hesari, A., & Hosseini, M. J. (2023). Eदारavone Improves Streptozotocin-Induced Memory Impairment via Alleviation of Behavioral Dysfunction, Oxidative Stress, Inflammation, and Histopathological Parameters. *Behavioural Neurology*, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/9652513>
- Assefa, B. T., Tafere, G. G., Wondafrash, D. Z., & Gidey, M. T. (2020). The Bewildering Effect of AMPK Activators in Alzheimer's Disease: Review of the Current Evidence. *BioMed Research International*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/9895121>
- Ayoub, S., & Melzig, M. F. (2008). Influence of selected natural products on neutral endopeptidase activity and  $\beta$ -amyloid production in SK-N-SH cells. *Pharmaceutical Biology*, 46(6), 425–432. <https://doi.org/10.1080/13880200802055891>
- Bagaméry, F., Varga, K., Kecsmár, K., Vincze, I., Szökő, É., & Tábi, T. (2020). Lack of insulin resistance in response to streptozotocin treatment in neuronal SH-SY5Y cell line. *Journal of Neural Transmission*, 127(1), 71–80. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02118-5>
- Bakaeva, Z., Lizunova, N., Tarzhanov, I., Boyarkin, D., Petrichuk, S., Pinelis, V., Fisenko, A., Tuzikov, A., Sharipov, R., & Surin, A. (2022). Lipopolysaccharide From E. coli Increases Glutamate-Induced Disturbances of Calcium Homeostasis, the Functional State of Mitochondria, and the Death of Cultured Cortical Neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14(January), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.811171>
- Banerjee, R. (2014). Effect of Curcumin on the metal ion induced fibrillization of Amyloid- $\beta$  peptide. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 117, 798–800. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.09.064>
- Bassani, T. B., Turnes, J. M., Moura, E. L. R., Bonato, J. M., Cóppola-Segovia, V., Zanata, S. M., Oliveira, R. M. M. W., & Vital, M. A. B. F. (2017). Effects of curcumin on short-term spatial and recognition memory, adult neurogenesis and neuroinflammation in a streptozotocin-induced rat model of dementia of Alzheimer's type. *Behavioural Brain Research*, 335, 41–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.08.014>
- Beard, E., Lengacher, S., Dias, S., Magistretti, P. J., & Finsterwald, C. (2022). Astrocytes as Key Regulators of Brain Energy Metabolism: New Therapeutic Perspectives. *Frontiers in Physiology*, 12(January). <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.825816>
- Behl, M., Zhang, Y., & Zheng, W. (2009). Involvement of insulin-degrading enzyme in the clearance of beta-amyloid at the blood-CSF barrier: Consequences of lead exposure. *Cerebrospinal Fluid Research*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1743-8454-6-11>
- Benameur, T., Giacomucci, G., Panaro, M. A., Ruggiero, M., Trotta, T., Monda, V., Pizzolorusso, I., Lofrumento, D. D., Porro, C., & Messina, G. (2022). New Promising Therapeutic Avenues of Curcumin in Brain Diseases. *Molecules*, 27(1). <https://doi.org/10.3390/molecules27010236>
- Benito, C., Tolón, R. M., Castillo, A. I., Ruiz-Valdepeñas, L., Martínez-Orgado, J. A., Fernández-Sánchez, F. J., Vázquez, C., Cravatt, B. F., & Romero, J. (2012).  $\beta$ -Amyloid exacerbates inflammation in astrocytes lacking fatty acid amide hydrolase through a mechanism involving PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$  and TRPV1, but not CB1 or CB2 receptors. *British Journal of Pharmacology*, 166(4), 1474–1489. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01889.x>
- Bernardo, A., & Minghetti, L. (2007). PPAR- $\gamma$ ; Agonists as Regulators of Microglial Activation

and Brain Inflammation. *Current Pharmaceutical Design*, 12(1), 93–109.  
<https://doi.org/10.2174/138161206780574579>

- Bernardo, A., Plumitallo, C., De Nuccio, C., Visentin, S., & Minghetti, L. (2021). Curcumin promotes oligodendrocyte differentiation and their protection against TNF- $\alpha$  through the activation of the nuclear receptor PPAR- $\gamma$ . *Scientific Reports*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83938-y>
- Bharti, A. C., Donato, N., & Aggarwal, B. B. (2003). Curcumin (Diferuloylmethane) Inhibits Constitutive and IL-6-Inducible STAT3 Phosphorylation in Human Multiple Myeloma Cells. *The Journal of Immunology*, 171(7), 3863–3871. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.7.3863>
- Bhuvanendran, S., Paudel, Y. N., Kumari, Y., Othman, I., & Shaikh, M. F. (2022). Embelin prevents amyloid-beta accumulation via modulation of SOD1 in a Streptozotocin-induced AD-like condition: An evidence from in vitro investigation. *Current Research in Neurobiology*, 3(March 2021), 100032. <https://doi.org/10.1016/j.crneur.2022.100032>
- Bianchi, R., Giambanco, I., & Donato, R. (2010). S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1beta and TNF-alpha. *Neurobiology of Aging*, 31(4), 665–677. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.017>
- Biasibetti, R., Almeida dos Santos, J. P., Rodrigues, L., Wartchow, K. M., Suardi, L. Z., Nardin, P., Selistre, N. G., Vázquez, D., & Gonçalves, C. A. (2017). Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer's disease are dependent on sex. *Behavioural Brain Research*, 316, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.08.057>
- Biasibetti, R., Tramontina, A. C., Costa, A. P., Dutra, M. F., Quincozes-Santos, A., Nardin, P., Bernardi, C. L., Wartchow, K. M., Lunardi, P. S., & Gonçalves, C. A. (2013). Green tea (-)epigallocatechin-3-gallate reverses oxidative stress and reduces acetylcholinesterase activity in a streptozotocin-induced model of dementia. *Behavioural Brain Research*, 236(1), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.08.039>
- Birch, A. M. (2014). The contribution of astrocytes to Alzheimer's disease. *Biochemical Society Transactions*, 42(5), 1316–1320. <https://doi.org/10.1042/BST20140171>
- Biswas, J., Gupta, S., Verma, D. K., & Singh, S. (2017). Streptozotocin alters glucose transport, connexin expression and endoplasmic reticulum functions in neurons and astrocytes. In *Neuroscience* (Vol. 356). IBRO. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.05.018>
- Blanco-Suárez, E., Caldwell, A. L. M., & Allen, N. J. (2017). Role of astrocyte–synapse interactions in CNS disorders. *Journal of Physiology*, 595(6), 1903–1916. <https://doi.org/10.1113/JP270988>
- Boyd, R. J., Avramopoulos, D., Jantzie, L. L., & McCallion, A. S. (2022). Neuroinflammation represents a common theme amongst genetic and environmental risk factors for Alzheimer and Parkinson diseases. *Journal of Neuroinflammation*, 19(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02584-x>
- Brandebura, A. N., Paumier, A., Onur, T. S., & Allen, N. J. (2023). Astrocyte contribution to dysfunction, risk and progression in neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 24(1), 23–39. <https://doi.org/10.1038/s41583-022-00641-1>
- Browne, R. W., & Armstrong, D. (1998). Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 108, 347–352. <https://doi.org/10.1385/0-89603-472-0:347>
- Bukke, V. N., Archana, M., Villani, R., Romano, A. D., Wawrzyniak, A., Balawender, K., Orkisz, S., Beggiato, S., Serviddio, G., & Cassano, T. (2020). The dual role of glutamatergic neurotransmission in Alzheimer's disease: From pathophysiology to pharmacotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 1–29. <https://doi.org/10.3390/ijms21207452>
- Burillo, J., Marqués, P., Jiménez, B., González-Blanco, C., Benito, M., & Guillén, C. (2021). Insulin Resistance and Diabetes Mellitus in Alzheimer's Disease. *Cells*, 10(5), 1236.

<https://doi.org/10.3390/cells10051236>

- Calabrò, M., Rinaldi, C., Santoro, G., & Crisafulli, C. (2021). The biological pathways of Alzheimer disease: a review. *AIMS Neuroscience*, *8*(1), 86–132. <https://doi.org/10.3934/Neuroscience.2021005>
- Camacho, I. E., Serneels, L., Spittaels, K., Merchiers, P., Dominguez, D., & De Strooper, B. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  induces a clearance mechanism for the amyloid- $\beta$  peptide. *Journal of Neuroscience*, *24*(48), 10908–10917. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3987-04.2004>
- Chaffer, C. L., Thomas, D. M., Thompson, E. W., & Williams, E. D. (2006). PPAR $\gamma$ -independent induction of growth arrest and apoptosis in prostate and bladder carcinoma. *BMC Cancer*, *6*, 53. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-53>
- Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, *38*(9), 1205–1235. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>
- Chen, K., An, Y., Tie, L., Pan, Y., & Li, X. (2015). Curcumin Protects Neurons from Glutamate-Induced Excitotoxicity by Membrane Anchored AKAP79-PKA Interaction Network. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/706207>
- Chen, M., Du, Z. Y., Zheng, X., Li, D. L., Zhou, R. P., & Zhang, K. (2018). Use of curcumin in diagnosis, prevention, and treatment of Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, *13*(4), 742–752. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.230303>
- Chen, P. T., Chen, Z. Ten, Hou, W. C., Yu, L. C., & Chen, R. P. Y. (2016). Polyhydroxycurcuminoids but not curcumin upregulate neprilysin and can be applied to the prevention of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, *6*(June), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep29760>
- Chen, Y., Qin, C., Huang, J., Tang, X., Liu, C., Huang, K., Xu, J., Guo, G., Tong, A., & Zhou, L. (2020). The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. *Cell Proliferation*, *53*(3), 1–13. <https://doi.org/10.1111/cpr.12781>
- Cheng, A. L., Hsu, C. H., Lin, J. K., Hsu, M. M., Ho, Y. F., Shen, T. S., Ko, J. Y., Lin, J. T., Lin, B. R., Ming-Shiang, W., Yu, H. S., Jee, S. H., Chen, G. S., Chen, T. M., Chen, C. A., Lai, M. K., Pu, Y. S., Pan, M. H., Wang, Y. J., ... Hsieh, C. Y. (2001). Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Research*, *21*(4B), 2895–2900.
- Chung, W.-S., Welsh, C. A., Barres, B. A., & Stevens, B. (2015). Do glia drive synaptic and cognitive impairment in disease? *Nature Neuroscience*, *18*(11), 1539–1545. <https://doi.org/10.1038/nn.4142>
- Cristiano, L., Bernardo, A., & Cerù, M. P. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and peroxisomes in rat cortical and cerebellar astrocytes. *Journal of Neurocytology*, *30*(8), 671–683. <https://doi.org/10.1023/A:1016525716209>
- Cullingford, T. E., Bhakoo, K., Peuchen, S., Dolphin, C. T., Patel, R., & Clark, J. B. (1998). Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  and the retinoid X receptor  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  in rat central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, *70*(4), 1366–1375. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70041366.x>
- d'Angelo, M., Castelli, V., Catanesi, M., Antonosante, A., Dominguez-Benot, R., Ippoliti, R., Benedetti, E., & Cimini, A. (2019). PPAR $\gamma$  and cognitive performance. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(20), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms20205068>
- da Costa, I. M., de Moura Freire, M. A., de Paiva Cavalcanti, J. R. L., de Araújo, D. P., Norrara, B., Moreira Rosa, I. M. M., de Azevedo, E. P., do Rego, A. C. M., Filho, I. A., & Guzen, F. P. (2018). Supplementation with Curcuma longa Reverses Neurotoxic and Behavioral Damage in Models of Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Current Neuropharmacology*, *17*(5),

406–421. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180117112610>

- Da Ré, C., Souza, J. M., Fróes, F., Taday, J., dos Santos, J. P., Rodrigues, L., Sesterheim, P., Gonçalves, C. A., & Leite, M. C. (2020). Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide leads to memory impairment and alterations in hippocampal leptin signaling. *Behavioural Brain Research*, 379(November 2019), 112360. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112360>
- Davis, N., Mota, B. C., Stead, L., Palmer, E. O. C., Lombardero, L., Rodríguez-Puertas, R., de Paola, V., Barnes, S. J., & Sastre, M. (2021a). Pharmacological ablation of astrocytes reduces A $\beta$  degradation and synaptic connectivity in an ex vivo model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02117-y>
- Davis, N., Mota, B. C., Stead, L., Palmer, E. O. C., Lombardero, L., Rodríguez-Puertas, R., de Paola, V., Barnes, S. J., & Sastre, M. (2021b). Pharmacological ablation of astrocytes reduces A $\beta$  degradation and synaptic connectivity in an ex vivo model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 18(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02117-y>
- De Strooper, B., & Karran, E. (2016). The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell*, 164(4), 603–615. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.056>
- Di Donfrancesco, A., Berlingieri, C., Giacomello, M., Frascarelli, C., Magalhaes Rebelo, A. P., Bindoff, L. A., Reeval, S., Renbaum, P., Santorelli, F. M., Massaro, G., Viscomi, C., Zeviani, M., Ghezzi, D., Bottani, E., & Brunetti, D. (2023). PPAR-gamma agonist pioglitazone recovers mitochondrial quality control in fibroblasts from PITRM1-deficient patients. *Frontiers in Pharmacology*, 14(July), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1220620>
- Di Meo, F., Valentino, A., Petillo, O., Peluso, G., Filosa, S., & Crispi, S. (2020). Bioactive polyphenols and neuromodulation: Molecular mechanisms in neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms21072564>
- Diab, A., Deng, C., Smith, J. D., Hussain, R. Z., Phanavanh, B., Lovett-Racke, A. E., Drew, P. D., & Racke, M. K. (2002). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Agonist 15-Deoxy- $\Delta$ 12,1412,14-Prostaglandin J2 Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 168(5), 2508–2515. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.5.2508>
- Donato, R. (2001). S100: A multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 33(7), 637–668. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(01\)00046-2](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(01)00046-2)
- Dos Santos, J. P. A., Vizuete, A., Hansen, F., Biasibetti, R., & Gonçalves, C. A. (2018). Early and Persistent O-GlcNAc Protein Modification in the Streptozotocin Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 61(1), 237–249. <https://doi.org/10.3233/JAD-170211>
- Dourado, N. S., Souza, C. dos S., de Almeida, M. M. A., Bispo da Silva, A., dos Santos, B. L., Silva, V. D. A., De Assis, A. M., da Silva, J. S., Souza, D. O., Costa, M. de F. D., Butt, A. M., & Costa, S. L. (2020). Neuroimmunomodulatory and Neuroprotective Effects of the Flavonoid Apigenin in in vitro Models of Neuroinflammation Associated With Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00119>
- Du, H., Meng, X., Yao, Y., & Xu, J. (2022). The mechanism and efficacy of GLP-1 receptor agonists in the treatment of Alzheimer's disease. *Frontiers in Endocrinology*, 13(November), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1033479>
- Duara, R., & Barker, W. (2022). Heterogeneity in Alzheimer's Disease Diagnosis and Progression Rates: Implications for Therapeutic Trials. *Neurotherapeutics*, 19(1), 8–25. <https://doi.org/10.1007/s13311-022-01185-z>
- Eghbaliferiz, S., Farhadi, F., Barreto, G. E., Majeed, M., & Sahebkar, A. (2020). Effects of curcumin on neurological diseases: focus on astrocytes. *Pharmacological Reports*, 72(4), 769–782. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00112-3>
- Erfen, Ş., & Akbay Çetin, E. (2022). Therapeutic and Preventive Effects of Piperine and its

Combination with Curcumin as a Bioenhancer Against Aluminum-Induced Damage in the Astrocyte Cells. *Neurotoxicity Research*, 40(6), 2027–2045. <https://doi.org/10.1007/s12640-022-00600-9>

- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O’Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W.-T., Cohen-Salmon, M., ... Gonçalves, C. A. (2016). Early and Persistent O-GlcNAc Protein Modification in the Streptozotocin Model of Alzheimer’s Disease. *Journal of Alzheimer’s Disease*, 164(2), 375–385. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.05.046>
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O’Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W.-T., Cohen-Salmon, M., ... Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature Neuroscience*, 24(3), 312–325. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>
- Escribano, L., Simón, A. M., Gimeno, E., Cuadrado-Tejedor, M., De Maturana, R. L., García-Osta, A., Ricobaraza, A., Pérez-Mediavilla, A., Río, J. Del, & Frechilla, D. (2010). Rosiglitazone rescues memory impairment in Alzheimer’s transgenic mice: Mechanisms involving a reduced amyloid and tau pathology. *Neuropsychopharmacology*, 35(7), 1593–1604. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.32>
- Esposito, G., Capoccia, E., Turco, F., Palumbo, I., Lu, J., Steardo, A., Cuomo, R., Sarnelli, G., & Steardo, L. (2014). Palmitoylethanolamide improves colon inflammation through an enteric glia/toll like receptor 4-dependent PPAR- $\alpha$  activation. *Gut*, 63(8), 1300–1312. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305005>
- Espuny-Camacho, I., Dominguez, D., Merchiers, P., Van Rompaey, L., Selkoe, D., & De Strooper, B. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma enhances the activity of an insulin degrading enzyme-like metalloprotease for amyloid- $\beta$ . *Journal of Alzheimer’s Disease*, 20(4), 1119–1132. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-091633>
- Farbood, Y., Sarkaki, A., Mahdavinia, M., Ghadiri, A., Teimoori, A., Seif, F., Dehghani, M. A., & Navabi, S. P. (2020). Protective Effects of Co-administration of Zinc and Selenium Against Streptozotocin-Induced Alzheimer’s Disease: Behavioral, Mitochondrial Oxidative Stress, and GPR39 Expression Alterations in Rats. *Neurotoxicity Research*, 38(2), 398–407. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00226-9>
- Farris, W., Mansourian, S., Chang, Y., Lindsley, L., Eckman, E. A., Frosch, M. P., Eckman, C. B., Tanzi, R. E., Selkoe, D. J., & Guénette, S. (2003). Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid  $\beta$ -protein, and the  $\beta$ -amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 4162–4167. <https://doi.org/10.1073/pnas.0230450100>
- Feng, H. L., Dang, H. Z., Fan, H., Chen, X. P., Rao, Y. X., Ren, Y., Yang, J. D., Shi, J., Wang, P. W., & Tian, J. Z. (2016). Curcumin ameliorates insulin signalling pathway in brain of Alzheimer’s disease transgenic mice. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 29(4), 734–741. <https://doi.org/10.1177/0394632016659494>
- Fernandez, M. O., Hsueh, K., Park, H. T., Saucedo, C., Hwang, V., Kumar, D., Kim, S., Rickert, E., Mahata, S., & Webster, N. J. G. (2017). Astrocyte-specific deletion of peroxisome-proliferator activated receptor-g impairs glucose metabolism and estrous cycling in female mice. *Journal of the Endocrine Society*, 1(11), 1332–1350. <https://doi.org/10.1210/js.2017-00242>
- Ferreira, N., Gonçalves, N. P., Saraiva, M. J., & Almeida, M. R. (2016). Curcumin: A multi-Target disease-modifying agent for late-stage transthyretin amyloidosis. *Scientific Reports*, 6(May), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep26623>
- Figueira, I., Garcia, G., Pimpão, R. C., Terrasso, A. P., Costa, I., Almeida, A. F., Tavares, L., Pais, T.

- F., Pinto, P., Ventura, M. R., Filipe, A., McDougall, G. J., Stewart, D., Kim, K. S., Palmela, I., Brites, D., Brito, M. A., Brito, C., & Santos, C. N. (2017). Polyphenols journey through blood-brain barrier towards neuronal protection. *Scientific Reports*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11512-6>
- Frost, G. R., & Li, Y. M. (2017). The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease. *Open Biology*, 7(12), 1–14. <https://doi.org/10.1098/rsob.170228>
- Garcia-Alloza, M., Borrelli, L. A., Rozkalne, A., Hyman, B. T., & Bacskai, B. J. (2007). Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. *Journal of Neurochemistry*, 102(4), 1095–1104. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04613.x>
- Garcia-Baos, A., Pastor, A., Gallego-Landin, I., Torre, R. de la, Sanz, F., & Valverde, O. (2023). PPAR- $\gamma$  is a promising therapeutic target for memory deficits induced by early alcohol exposure. *BioRxiv*, 2023.01.20.524912. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.01.20.524912v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.01.20.524912v1.abstract>
- Gauthier S, Webster C, Servaes S, Morais JA, R.-N. P. (2022). World Alzheimer Report 2022: Life after diagnosis: Navigating treatment, care and support. *Alzheimer's Disease International*, 1–414.
- Gejl, M., Gjedde, A., Egefjord, L., Møller, A., Hansen, S. B., Vang, K., Rodell, A., Brændgaard, H., Gottrup, H., Schacht, A., Møller, N., Brock, B., & Rungby, J. (2016). In Alzheimer's disease, 6-month treatment with GLP-1 analog prevents decline of brain glucose metabolism: Randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8(MAY), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00108>
- Genrikhs, E. E., Stelmashook, E. V., Golyshev, S. A., Aleksandrova, O. P., & Isaev, N. K. (2017). Streptozotocin causes neurotoxic effect in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Research Bulletin*, 130, 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.01.004>
- Gomez-Isla, T. (1997). Neuronal Loss Correlates with but Exceeds Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease. *Annals of Neurology*, 41(1), 17–24.
- Gonçalves, C. A., Conclite Leite, M., & Nardin, P. (2008). Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clinical Biochemistry*, 41(10–11), 755–763. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.04.003>
- Gonçalves, C. A., Rodrigues, L., Bobermin, L. D., Zanotto, C., Vizuete, A., Quincozes-Santos, A., Souza, D. O., & Leite, M. C. (2018). Glycolysis-derived compounds from astrocytes that modulate synaptic communication. *Frontiers in Neuroscience*, 12(January), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.01035>
- Gonzales, M. M., Garbarino, V. R., Pollet, E., Palavicini, J. P., Kellogg, D. L., Kraig, E., & Orr, M. E. (2022). Biological aging processes underlying cognitive decline and neurodegenerative disease. *Journal of Clinical Investigation*, 132(10), 1–10. <https://doi.org/10.1172/JCI158453>
- Goshi, N., Morgan, R. K., Lein, P. J., & Seker, E. (2020). A primary neural cell culture model to study neuron, astrocyte, and microglia interactions in neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01819-z>
- Gottfried, C., Tramontina, F., Gonçalves, D., Gonçalves, C. A., Moriguchi, E., Dias, R. D., Wofchuk, S. T., & Souza, D. O. (2002). Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: A study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123(10), 1333–1340. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(02\)00069-6](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(02)00069-6)
- Gottfried, C., Valentim, L., Salbego, C., Karl, J., Wofchuk, S. T., & Rodnight, R. (1999). Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: Specific effects on the



- phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). *Brain Research*, 833(2), 142–149. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01503-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01503-6)
- Govindarajulu, M., Pinky, P. D., Bloemer, J., Ghanei, N., Suppiramaniam, V., & Amin, R. (2018). Signaling Mechanisms of Selective PPAR  $\gamma$  Modulators in Alzheimer's Disease. *PPAR Research*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2010675>
- Grieb, P. (2016). Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Molecular Neurobiology*, 53(3), 1741–1752. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9132-3>
- Griffin, W. S. T., Sheng, J. G., Royston, M. C., Gentleman, S. M., McKenzie, J. E., Graham, D. I., Roberts, G. W., & Mrak, R. E. (1998). Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: The potential role of a "cytokine cycle" in disease progression. *Brain Pathology*, 8(1), 65–72. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1998.tb00136.x>
- Griggs, R. B., Donahue, R. R., Morgenweck, J., Grace, P. M., Sutton, A., Watkins, L. R., & Taylor, B. K. (2015). Pioglitazone rapidly reduces neuropathic pain through astrocyte and nongenomic PPAR $\gamma$  mechanisms. *Pain*, 156(3), 469–482. <https://doi.org/10.1097/01.j.pain.0000460333.79127.be>
- Gu, G., Ren, J., Zhu, B., Shi, Z., Feng, S., & Wei, Z. (2023). Multiple mechanisms of curcumin targeting spinal cord injury. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 159(December 2022), 114224. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114224>
- Guerra, M. C., Tortorelli, L. S., Galland, F., Da Ré, C., Negri, E., Engelke, D. S., Rodrigues, L., Leite, M. C., & Gonçalves, C. A. (2011). Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: A study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *Journal of Neuroinflammation*, 8(1), 128. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-128>
- Haan, C., & Behrmann, I. (2007). A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. *Journal of Immunological Methods*, 318(1–2), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.07.027>
- Hamelin, L., Lagarde, J., Dorothée, G., Leroy, C., Labit, M., Comley, R. A., De Souza, L. C., Corne, H., Dauphinot, L., Bertoux, M., Dubois, B., Gervais, P., Colliot, O., Potier, M. C., Bottlaender, M., & Sarazin, M. (2016). Early and protective microglial activation in Alzheimer's disease: A prospective study using 18F-DPA-714 PET imaging. *Brain*, 139(4), 1252–1264. <https://doi.org/10.1093/brain/aww017>
- Hansen, F., Battú, C. E., Dutra, M. F., Galland, F., Lirio, F., Broetto, N., Nardin, P., & Gonçalves, C. A. (2016). Methylglyoxal and carboxyethyllysine reduce glutamate uptake and S100B secretion in the hippocampus independently of RAGE activation. *Amino Acids*, 48(2), 375–385. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2091-1>
- Hansen, F., Galland, F., Lirio, F., De Souza, D. F., Da Ré, C., Pacheco, R. F., Vizuete, A. F., Quincozes-Santos, A., Leite, M. C., & Gonçalves, C. A. (2017). Methylglyoxal Induces Changes in the Glyoxalase System and Impairs Glutamate Uptake Activity in Primary Astrocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9574201>
- Hansen, F., Pandolfo, P., Galland, F., Torres, F. V., Dutra, M. F., Batassini, C., Guerra, M. C., Leite, M. C., & Gonçalves, C. A. (2016). Methylglyoxal can mediate behavioral and neurochemical alterations in rat brain. *Physiology and Behavior*, 164, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.05.046>
- Hansen, D. V., Hanson, J. E., & Sheng, M. (2018). Microglia in Alzheimer's disease. *Journal of Cell Biology*, 217(2), 459–472. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709069>
- Hardy, J., & Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12(C), 383–388. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(91\)90609-V](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90609-V)

- Hassel, B., Westergaard, N., Schousboe, A., & Fonnum, F. (1995). Metabolic differences between primary cultures of astrocytes and neurons from cerebellum and cerebral cortex. Effects of fluorocitrate. *Neurochemical Research*, *20*(4), 413–420. <https://doi.org/10.1007/BF00973096>
- Hefter, D., Ludewig, S., Draguhn, A., & Korte, M. (2020). Amyloid, APP, and Electrical Activity of the Brain. *Neuroscientist*, *26*(3), 231–251. <https://doi.org/10.1177/1073858419882619>
- Hellström-Lindahl, E., Ravid, R., & Nordberg, A. (2008). Age-dependent decline of neprilysin in Alzheimer's disease and normal brain: Inverse correlation with A $\beta$  levels. *Neurobiology of Aging*, *29*(2), 210–221. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.10.010>
- Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. El, Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, *14*(4), 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Heneka, M. T., & Landreth, G. E. (2007). PPARs in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1771*(8), 1031–1045. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.04.016>
- Heneka, M. T., Sastre, M., Dumitrescu-Ozimek, L., Hanke, A., Dewachter, I., Kuiperi, C., O'Banion, K., Klockgether, T., Van Leuven, F., & Landreth, G. E. (2005). Acute treatment with the PPAR $\gamma$  agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and A $\beta$ 1-42 levels in APPV717I transgenic mice. *Brain*, *128*(6), 1442–1453. <https://doi.org/10.1093/brain/awh452>
- Hippius, H., & Neundörfer, G. (2003). The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *5*(1), 101–108. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2003.5.1/hhippius>
- Hoe, H. S., Lee, H. K., & Pak, D. T. S. (2012). The upside of APP at synapses. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, *18*(1), 47–56. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2010.00221.x>
- Hofmann, M. A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., Avila, C., Kambham, N., Bierhaus, A., Nawroth, P., Neurath, M. F., Slaterry, T., Beach, D., McClary, J., Nagashima, M., Morser, J., Stern, D., & Schmidt, A. M. (1999). RAGE mediates a novel proinflammatory axis: A central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*, *97*(7), 889–901. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80801-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80801-6)
- Hong, S., Xin, Y., HaiQin, W., GuiLian, Z., Ru, Z., ShuQin, Z., HuQing, W., Li, Y., & Yun, D. (2012). The PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone prevents cognitive impairment by inhibiting astrocyte activation and oxidative stress following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurological Sciences*, *33*(3), 559–566. <https://doi.org/10.1007/s10072-011-0774-2>
- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S. G., Croteau, D. L., & Bohr, V. A. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*, *15*(10), 565–581. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0244-7>
- Hristov, M., Nankova, A., & Andreeva-Gateva, P. (2024). Alterations of the glutamatergic system in diabetes mellitus. *Metabolic Brain Disease*, *39*(2), 321–333. <https://doi.org/10.1007/s11011-023-01299-z>
- Ireson, C. R., Jones, D. J. L., Orr, S., Coughtrie, M. W. H., Boocock, D. J., Williams, M. L., Farmer, P. B., Steward, W. P., & Gescher, A. J. (2002). Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *11*(1), 105–111.
- Isaev, N. K., Genrikhs, E. E., Voronkov, D. N., Kapkaeva, M. R., & Stelmashook, E. V. (2018). Streptozotocin toxicity in vitro depends on maturity of neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *348*(February), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.04.024>
- Ishrat, T., Hoda, M. N., Khan, M. B., Yousuf, S., Ahmad, M., Khan, M. M., Ahmad, A., & Islam, F.

- (2009). Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). *European Neuropsychopharmacology*, *19*(9), 636–647. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2009.02.002>
- Islam, F., Javed, H., Vaibhav, K., Ahmed, M. E., Khan, A., Tabassum, R., Islam, F., & Safhi, M. M. (2015). Effect of hesperidin on neurobehavioral, neuroinflammation, oxidative stress and lipid alteration in intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment in mice. *Journal of the Neurological Sciences*, *348*(1–2), 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2014.10.044>
- Ismail, R., Parbo, P., Madsen, L. S., Hansen, A. K., Hansen, K. V., Schaldemose, J. L., Kjeldsen, P. L., Stokholm, M. G., Gottrup, H., Eskildsen, S. F., & Brooks, D. J. (2020). The relationships between neuroinflammation, beta-amyloid and tau deposition in Alzheimer's disease: A longitudinal PET study. *Journal of Neuroinflammation*, *17*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01820-6>
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Shirotani, K., Lu, B., Gerard, N. P., Gerard, C., Hama, E., Lee, H. J., & Saido, T. C. (2001). Metabolic regulation of brain A $\beta$  by neprilysin. *Science*, *292*(5521), 1550–1552. <https://doi.org/10.1126/science.1059946>
- Jacob, A., Wu, R., Zhou, M., & Wang, P. (2007). Mechanism of the anti-inflammatory effect of curcumin: PPAR- $\gamma$  activation. *PPAR Research*, *2007*. <https://doi.org/10.1155/2007/89369>
- Jash, K., Gondaliya, P., Kirave, P., Kulkarni, B., Sunkaria, A., & Kalia, K. (2020). Cognitive dysfunction: A growing link between diabetes and Alzheimer's disease. *Drug Development Research*, *81*(2), 144–164. <https://doi.org/10.1002/ddr.21579>
- Jinwal, U. K., Akoury, E., Abisambra, J. F., O'Leary, J. C. 3rd, Thompson, A. D., Blair, L. J., Jin, Y., Bacon, J., Nordhues, B. A., Cockman, M., Zhang, J., Li, P., Zhang, B., Borysov, S., Uversky, V. N., Biernat, J., Mandelkow, E., Gestwicki, J. E., Zweckstetter, M., & Dickey, C. A. (2013). Imbalance of Hsp70 family variants fosters tau accumulation. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *27*(4), 1450–1459. <https://doi.org/10.1096/fj.12-220889>
- Johansson, C., Thordardottir, S., Laffita-Mesa, J., Rodriguez-Vieitez, E., Zetterberg, H., Blennow, K., & Graff, C. (2023). Plasma biomarker profiles in autosomal dominant Alzheimer's disease. *Brain*, *146*(3), 1132–1140. <https://doi.org/10.1093/brain/awac399>
- Kamat, Pradip K., Kalani, A., Rai, S., Tota, S. K., Kumar, A., & Ahmad, A. S. (2016). Streptozotocin Intracerebroventricular-Induced Neurotoxicity and Brain Insulin Resistance: a Therapeutic Intervention for Treatment of Sporadic Alzheimer's Disease (sAD)-Like Pathology. *Molecular Neurobiology*, *53*(7), 4548–4562. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9384-y>
- Kamat, Pradip Kumar. (2015). Streptozotocin induced Alzheimer's disease like changes and the underlying neural degeneration and regeneration mechanism. *Neural Regeneration Research*, *10*(7), 1050–1052. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.160076>
- Kametani, F., & Hasegawa, M. (2018). Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, *12*(JAN). <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00025>
- Kato, D., Takahashi, Y., Iwata, H., Hatakawa, Y., Lee, S. H., & Oe, T. (2022). Comparative studies for amyloid beta degradation: “Neprilysin vs insulysin”, “monomeric vs aggregate”, and “whole A $\beta$ 40 vs its peptide fragments.” *Biochemistry and Biophysics Reports*, *30*(March), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101268>
- Katsouri, L., Parr, C., Bogdanovic, N., Willem, M., & Sastre, M. (2011). PPAR $\gamma$  co-activator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) reduces amyloid- $\beta$  generation through a PPAR $\gamma$ -dependent mechanism. *Journal of Alzheimer's Disease*, *25*(1), 151–162. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-101356>
- Khan, M. A., Alam, Q., Haque, A., Ashafaq, M., Khan, M. J., Ashraf, G. M., & Ahmad, M. (2018). Current Progress on Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma Agonist as an Emerging

- Therapeutic Approach for the Treatment of Alzheimer's Disease: An Update. *Current Neuropharmacology*, 17(3), 232–246. <https://doi.org/10.2174/1570159x16666180828100002>
- Kim, J., Han, D., Byun, S. H., Kwon, M., Cho, S. J., Koh, Y. H., & Yoon, K. (2017). Nephilysin facilitates adipogenesis through potentiation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 430(1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-2948-6>
- Kim, S. G., & Lee, W. H. (2010). AMPK-dependent metabolic regulation by PPAR agonists. *PPAR Research*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/549101>
- Kim, Y., Rouse, M., González-Mariscal, I., Egan, J. M., & O'Connell, J. F. (2019). Dietary curcumin enhances insulin clearance in diet-induced obese mice via regulation of hepatic PI3K-AKT axis and IDE, and preservation of islet integrity. *Nutrition and Metabolism*, 16(1), V. <https://doi.org/10.1186/s12986-019-0377-0>
- Kitamura, Y., Shimohama, S., Koike, H., Kakimura, J., Matsuoka, Y., Nomura, Y., Gebicke-haerter, P. J., & Taniguchi, T. (1999). *Increased Expression of Cyclooxygenases and in Alzheimer 's Disease Brains*. 586, 582–586.
- Koo, B. B., Calderazzo, S., Bowley, B. G. E., Kolli, A., Moss, M. B., Rosene, D. L., & Moore, T. L. (2018). Long-term effects of curcumin in the non-human primate brain. *Brain Research Bulletin*, 142, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.06.015>
- Kundaikar, H. S., & Degani, M. S. (2015). Insights into the Interaction Mechanism of Ligands with A $\beta$ 42 Based on Molecular Dynamics Simulations and Mechanics: Implications of Role of Common Binding Site in Drug Design for Alzheimer's Disease. *Chemical Biology and Drug Design*, 86(4), 805–812. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12555>
- Kurz, A., & Perneczky, R. (2011). Amyloid clearance as a treatment target against alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 24(SUPPL. 2), 61–73. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-102139>
- Lamichhane, G., Liu, J., Lee, S.-J., Lee, D.-Y., Zhang, G., & Kim, Y. (2024). Curcumin Mitigates the High-Fat High-Sugar Diet-Induced Impairment of Spatial Memory, Hepatic Metabolism, and the Alteration of the Gut Microbiome in Alzheimer's Disease-Induced (3xTg-AD) Mice. *Nutrients*, 16(2), 240. <https://doi.org/10.3390/nu16020240>
- Lampthey, R. N. L., Chaulagain, B., Trivedi, R., Gothwal, A., Layek, B., & Singh, J. (2022). A Review of the Common Neurodegenerative Disorders: Current Therapeutic Approaches and the Potential Role of Nanotherapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031851>
- Lannert, H., & Hoyer, S. (1998). Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behavioral Neuroscience*, 112(5), 1199–1208. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.112.5.1199>
- Lao, C. D., Ruffin IV, M. T., Normolle, D., Heath, D. D., Murray, S. I., Bailey, J. M., Boggs, M. E., Crowell, J., Rock, C. L., & Brenner, D. E. (2006). Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6, 4–7. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-10>
- Lavoie, S., Chen, Y., Dalton, T. P., Gysin, R., Cuénod, M., Steullet, P., & Do, K. Q. (2009). Curcumin, quercetin, and tBHQ modulate glutathione levels in astrocytes and neurons: Importance of the glutamate cysteine ligase modifier subunit. *Journal of Neurochemistry*, 108(6), 1410–1422. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05908.x>
- Leclerc, B., & Abulrob, A. (2013). Perspectives in molecular imaging using staging biomarkers and immunotherapies in alzheimer's disease. *The Scientific World Journal*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/589308>
- Lee, J. W., Lee, Y. K., Yuk, D. Y., Choi, D. Y., Ban, S. B., Oh, K. W., & Hong, J. T. (2008). Neuro-

- inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. *Journal of Neuroinflammation*, *5*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-37>
- Lee, S. J., Chandrasekran, P., Mazucanti, C. H., O’Connell, J. F., Egan, J. M., & Kim, Y. (2022). Dietary curcumin restores insulin homeostasis in diet-induced obese aged mice. *Aging*, *14*(1), 225–239. <https://doi.org/10.18632/aging.203821>
- Leesnitzer, L. M., Parks, D. J., Bledsoe, R. K., Cobb, J. E., Collins, J. L., Consler, T. G., Davis, R. G., Hull-Ryde, E. A., Lenhard, J. M., Patel, L., Plunket, K. D., Shenk, J. L., Stimmel, J. B., Therapontos, C., Willson, T. M., & Blanchard, S. G. (2002). Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry*, *41*(21), 6640–6650. <https://doi.org/10.1021/bi0159581>
- Leite, M. C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M. C., Bortolotto, J. W., Freitas, R., Almeida, L. M. V. de, Gottfried, C., & Gonçalves, C. A. (2008). A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *Journal of Neuroscience Methods*, *169*(1), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.11.021>
- Leng, F., & Edison, P. (2021). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nature Reviews Neurology*, *17*(3), 157–172. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>
- Li, K., Li, J., Zheng, J., & Qin, S. (2019). Reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Aging and Disease*, *10*(3), 664–675. <https://doi.org/10.14336/AD.2018.0720>
- Li, R., Zhang, Y., Rasool, S., Geetha, T., Babu, J. R., Kumar, B., Singh, V., Shankar, R., Kumar, K., Rawal, R., Koo, B. B., Calderazzo, S., Bowley, B. G. E., Kolli, A., Moss, M. B., Rosene, D. L., Moore, T. L., Jojo, G. M., Kuppusamy, G., ... Nomair, A. M. (2019). Downstream modulation of extrinsic apoptotic pathway in streptozotocin-induced Alzheimer’s dementia in rats: Erythropoietin versus curcumin. *Brain Research Bulletin*, *770*(1), 529–539. <https://doi.org/10.5662/wjm.v6.i1.112>
- Li, X. H., Xie, J. Z., Jiang, X., Lv, B. L., Cheng, X. S., Du, L. L., Zhang, J. Y., Wang, J. Z., & Zhou, X. W. (2012). Methylglyoxal induces tau hyperphosphorylation via promoting ages formation. *NeuroMolecular Medicine*, *14*(4), 338–348. <https://doi.org/10.1007/s12017-012-8191-0>
- Lissner, L. J., Rodrigues, L., Wartchow, K. M., Borba, E., Bobermin, L. D., Fontella, F. U., Hansen, F., Quincozes-Santos, A., Souza, D. O. G., & Gonçalves, C. A. (2021). Short-Term Alterations in Behavior and Astroglial Function After Intracerebroventricular Infusion of Methylglyoxal in Rats. *Neurochemical Research*, *46*(2), 183–196. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03154-4>
- Lissner, L. J., Wartchow, K. M., Rodrigues, L., Bobermin, L. D., Borba, E., Dias, V. G., Hansen, F., Quincozes-Santos, A., & Gonçalves, C. A. (2022). Acute Methylglyoxal-Induced Damage in Blood–Brain Barrier and Hippocampal Tissue. *Neurotoxicity Research*, *40*(5), 1337–1347. <https://doi.org/10.1007/s12640-022-00571-x>
- Liu, H., Li, Z., Qiu, D., Gu, Q., Lei, Q., & Mao, L. (2010). The inhibitory effects of different curcuminoids on  $\beta$ -amyloid protein,  $\beta$ -amyloid precursor protein and  $\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 in swAPP HEK293 cells. *Neuroscience Letters*, *485*(2), 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.08.035>
- Liu, L. P., Yan, T. H., Jiang, L. Y., Hu, W., Hu, M., Wang, C., Zhang, Q., Long, Y., Wang, J. Q., Li, Y. Q., Hu, M., & Hong, H. (2013). Pioglitazone ameliorates memory deficits in streptozotocin-induced diabetic mice by reducing brain  $\beta$ -amyloid through PPAR $\gamma$  activation. *Acta Pharmacologica Sinica*, *34*(4), 455–463. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.11>
- Liu, P. P., Xie, Y., Meng, X. Y., & Kang, J. S. (2019). History and progress of hypotheses and clinical trials for alzheimer’s disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *4*(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0063-8>

- Liu, Z. J., Li, Z. H., Liu, L., Tang, W. X., Wang, Y., Dong, M. R., & Xiao, C. (2016). Curcumin attenuates beta-amyloid-induced neuroinflammation via activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma function in a rat model of Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*, 7(AUG), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00261>
- Liu, Z. J., Liu, H. Q., Xiao, C., Fan, H. Z., Huang, Q., Liu, Y. H., & Wang, Y. (2014). Curcumin protects neurons against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced injury through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  function. *Journal of Neuroscience Research*, 92(11), 1549–1559. <https://doi.org/10.1002/jnr.23438>
- Long, J. M., & Holtzman, D. M. (2019). Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*, 179(2), 312–339. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.001>
- Maiti, P., & Dunbar, G. L. (2018). Use of curcumin, a natural polyphenol for targeting molecular pathways in treating age-related neurodegenerative diseases. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061637>
- Mandrekar-Colucci, S., Colleen Karlo, J., & Landreth, G. E. (2012). Mechanisms underlying the Rapid Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ -mediated Amyloid clearance and reversal of cognitive deficits in a murine model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 32(30), 10117–10128. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5268-11.2012>
- Mandrekar-Colucci, S., Sauerbeck, A., Popovich, P. G., & McTigue, D. M. (2013). PPAR agonists as therapeutics for CNS trauma and neurological diseases. *ASN Neuro*, 5(5), 347–362. <https://doi.org/10.1042/AN20130030>
- Martin, T. D., Malagodi, A. J., Chi, E. Y., & Evans, D. G. (2019). Computational Study of the Driving Forces and Dynamics of Curcumin Binding to Amyloid- $\beta$  Protofibrils. *Journal of Physical Chemistry B*, 123(3), 551–560. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b09185>
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015a). Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 1–18. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015b). Alzheimer's disease. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>
- Mawuenyega, K. G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J. C., Yarasheski, K. E., & Bateman, R. J. (2010). Decreased Clearance of CNS  $\beta$ -Amyloid in Alzheimer's Disease. *Science*, 330(6012), 1774–1774. <https://doi.org/10.1126/science.1197623>
- Mazidi, M., Karimi, E., Meydani, M., Ghayour-Mobarhan, M., & Ferns, G. A. (2016). Potential effects of curcumin on peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in vitro and in vivo. *World Journal of Methodology*, 6(1), 112. <https://doi.org/10.5662/wjm.v6.i1.112>
- Medeiros, R., Baglietto-Vargas, D., & Laferla, F. M. (2011). The Role of Tau in Alzheimer's Disease and Related Disorders. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 17(5), 514–524. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2010.00177.x>
- Miller, B. C., Eckman, E. A., Sambamurti, K., Dobbs, N., Martin Chow, K., Eckman, C. B., Hersh, L. B., & Thiele, D. L. (2003). Amyloid- $\beta$  peptide levels in brain are inversely correlated with insulysin activity levels in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 6221–6226. <https://doi.org/10.1073/pnas.1031520100>
- Miners, J. S., Barua, N., Kehoe, P. G., Gill, S., & Love, S. (2011). A $\beta$ -degrading enzymes: Potential for treatment of alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 70(11), 944–959. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182345e46>
- Minet, R., Villie, F., Marcollet, M., Meynial-Denis, D., & Cynober, L. (1997). Measurement of glutamine synthetase activity in rat muscle by a colorimetric assay. *Clinica Chimica Acta*, 268(1–2), 121–132. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(97\)00173-3](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(97)00173-3)

- Mohammadi, A., Colagar, A. H., Khorshidian, A., & Amini, S. M. (2022). The Functional Roles of Curcumin on Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *NeuroImmunoModulation*, 29(1), 4–14. <https://doi.org/10.1159/000517901>
- Moll, A., Ramirez, L. M., Ninov, M., Schwarz, J., Urlaub, H., & Zweckstetter, M. (2022). Hsp multichaperone complex buffers pathologically modified Tau. *Nature Communications*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31396-z>
- Moreira, A. P., Vizuete, A. F. K., Zin, L. E. F., de Marques, C. O., Pacheco, R. F., Leal, M. B., & Gonçalves, C.-A. (2022). The Methylglyoxal/RAGE/NOX-2 Pathway is Persistently Activated in the Hippocampus of Rats with STZ-Induced Sporadic Alzheimer’s Disease. *Neurotoxicity Research*, 40(2), 395–409. <https://doi.org/10.1007/s12640-022-00476-9>
- Mosconi, L., Pupi, A., & De Leon, M. J. (2008). Brain Glucose Hypometabolism and Oxidative Stress in Preclinical Alzheimer’s Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147(1), 180–195. <https://doi.org/10.1196/annals.1427.007>
- Mota, B. C., & Sastre, M. (2021). The role of pgc1 $\alpha$  in alzheimer’s disease and therapeutic interventions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/ijms22115769>
- Müller, U. C., Deller, T., & Korte, M. (2017). Not just amyloid: Physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(5), 281–298. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.29>
- Nantasenamat, C., Simeon, S., Kandhro, A., Prachayasittikul, V., Worachartcheewan, A., Songtawee, N., Srungboonmee, K., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Prachayasittikul, S., & Prachayasittikul, V. (2014). Chapter 2. *Elucidating the Structure-Activity Relationship of Curcumin and Its Biological Activities* (pp. 49–86).
- Ni, H., Jin, W., Zhu, T., Wang, J., Yuan, B., Jiang, J., Liang, W., & Ma, Z. (2015). Curcumin modulates TLR4/NF- $\kappa$ B inflammatory signaling pathway following traumatic spinal cord injury in rats. *Journal of Spinal Cord Medicine*, 38(2), 199–206. <https://doi.org/10.1179/2045772313Y.0000000179>
- Nichols, E., Szoeki, C. E. I., Vollset, S. E., Abbasi, N., Abd-Allah, F., Abdela, J., Aichour, M. T. E., Akinyemi, R. O., Alahdab, F., Asgedom, S. W., Awasthi, A., Barker-Collo, S. L., Baune, B. T., Béjot, Y., Belachew, A. B., Bennett, D. A., Biadgo, B., Bijani, A., Bin Sayeed, M. S., ... Murray, C. J. L. (2019). Global, regional, and national burden of Alzheimer’s disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, 18(1), 88–106. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30403-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30403-4)
- Nikkar, R., Esmaili-bandboni, A., Badrikoohi, M., & Babaei, P. (2022). Effects of inhibiting astrocytes and BET/BRD4 chromatin reader on spatial memory and synaptic proteins in rats with Alzheimer’s disease. *Metabolic Brain Disease*, 37(4), 1119–1131. <https://doi.org/10.1007/s11011-022-00940-7>
- Noor, N. A., Hosny, E. N., Khadrawy, Y. A., Mourad, I. M., Othman, A. I., Aboul Ezz, H. S., & Mohammed, H. S. (2022). Effect of curcumin nanoparticles on streptozotocin-induced male Wistar rat model of Alzheimer’s disease. *Metabolic Brain Disease*, 37(2), 343–357. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00897-z>
- Okello, A., Edison, P., Archer, H. A., Turkheimer, F. E., Kennedy, J., Bullock, R., Walker, Z., Kennedy, A., Fox, N., Rossor, M., & Brooks, D. J. (2009). Microglial activation and amyloid deposition in mild cognitive impairment: A PET study. *Neurology*, 72(1), 56–62. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000338622.27876.0d>
- Oliveira-Junior, M. S., Pereira, E. P., de Amorim, V. C. M., Reis, L. T. C., do Nascimento, R. P., da Silva, V. D. A., & Costa, S. L. (2019). Lupeol inhibits LPS-induced neuroinflammation in cerebellar cultures and induces neuroprotection associated to the modulation of astrocyte response and expression of neurotrophic and inflammatory factors. *International*

- Immunopharmacology*, 70(February), 302–312. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.02.055>
- Onuma, H., Inukai, K., Kitahara, A., Moriya, R., Nishida, S., Tanaka, T., Katsuta, H., Takahashi, K., Sumitani, Y., Hosaka, T., & Ishida, H. (2014). The glucagon-like peptide 1 receptor agonist enhances intrinsic peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activity in endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 451(2), 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.136>
- Orjuela, A., Lakey-Beitia, J., Mojica-Flores, R., Hegde, M. L., Lans, I., Alí-Torres, J., & Rao, K. S. (2021). Computational Evaluation of Interaction Between Curcumin Derivatives and Amyloid- $\beta$  Monomers and Fibrils: Relevance to Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 82(s1), S321–S333. <https://doi.org/10.3233/JAD-200941>
- Pan, M. H., Huang, T. M., & Lin, J. K. (1999). Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 27(4), 486–494.
- Park, J., Won, J., Seo, J., Yeo, H. G., Kim, K., Kim, Y. G., Jeon, C. Y., Kam, M. K., Kim, Y. H., Huh, J. W., Lee, S. R., Lee, D. S., & Lee, Y. (2020). Streptozotocin Induces Alzheimer's Disease-Like Pathology in Hippocampal Neuronal Cells via CDK5/Drp1-Mediated Mitochondrial Fragmentation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14(August), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00235>
- Park, J. Y., Sohn, H. Y., Koh, Y. H., & Jo, C. (2021). Curcumin activates Nrf2 through PKC $\delta$ -mediated p62 phosphorylation at Ser351. *Scientific Reports*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87225-8>
- Parr, C., Mirzaei, N., Christian, M., & Sastre, M. (2015). Activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway represses the transcription of the  $\beta$ -amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE1) via binding of T-cell factor-4 to BACE1 promoter. *FASEB Journal*, 29(2), 623–635. <https://doi.org/10.1096/fj.14-253211>
- Passeri, E., Elkhoury, K., Morsink, M., Broersen, K., Linder, M., Tamayol, A., Malaplate, C., Yen, F. T., & Arab-Tehrany, E. (2022). Alzheimer's Disease: Treatment Strategies and Their Limitations. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22). <https://doi.org/10.3390/ijms232213954>
- Patil, G. V., Joshi, R. S., Kazi, R. S., Kulsange, S. E., & Kulkarni, M. J. (2020). A possible role of glycation in the regulation of amyloid  $\beta$  precursor protein processing leading to amyloid  $\beta$  accumulation. *Medical Hypotheses*, 142(January), 109799. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109799>
- Paulsen, R. E., Contestabile, A., Villani, L., & Fonnum, F. (1987). An In Vivo Model for Studying Function of Brain Tissue Temporarily Devoid of Glial Cell Metabolism: The Use of Fluorocitrate. *Journal of Neurochemistry*, 48(5), 1377–1385. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1987.tb05674.x>
- Perales-Salinas, V., Purushotham, S. S., & Buskila, Y. (2024). Curcumin as a potential therapeutic agent for treating neurodegenerative diseases. *Neurochemistry International*, 178(June), 105790. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105790>
- Perrone, L., Mothes, E., Vignes, M., Mockel, A., Figueroa, C., Miquel, M. C., Maddelein, M. L., & Faller, P. (2010). Copper transfer from Cu-A $\beta$  to human serum albumin inhibits aggregation, radical production and reduces A $\beta$  toxicity. *ChemBioChem*, 11(1), 110–118. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900474>
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83(2), 346–356. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4)
- Philippens, I. H., Ormel, P. R., Baarends, G., Johansson, M., Remarque, E. J., & Doverskog, M.



- (2016). Acceleration of amyloidosis by inflammation in the amyloid-beta marmoset monkey model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 55(1), 101–113. <https://doi.org/10.3233/JAD-160673>
- Piemontese, L. (2017). New approaches for prevention and treatment of Alzheimer's disease: A fascinating challenge. *Neural Regeneration Research*, 12(3), 405–406. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.202942>
- Plaschke, K., & Kopitz, J. (2015). In vitro streptozotocin model for modeling Alzheimer-like changes: effect on amyloid precursor protein secretases and glycogen synthase kinase-3. *Journal of Neural Transmission*, 122(4), 551–557. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1319-7>
- Poirier, R., Wolfer, D. P., Welzl, H., Tracy, J., Galsworthy, M. J., Nitsch, R. M., & Mohajeri, M. H. (2006). Neuronal neprilysin overexpression is associated with attenuation of A $\beta$ -related spatial memory deficit. *Neurobiology of Disease*, 24(3), 475–483. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.08.003>
- Preman, P., Alfonso-Triguero, M., Alberdi, E., Verkhratsky, A., & Arranz, A. M. (2021). Astrocytes in Alzheimer's disease: Pathological significance and molecular pathways. *Cells*, 10(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/cells10030540>
- Priyadarsini, K. I. (2014). The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. *Molecules*, 19(12), 20091–20112. <https://doi.org/10.3390/molecules191220091>
- Qin, W., Haroutunian, V., Katsel, P., Cardozo, C. P., Ho, L., Buxbaum, J. D., & Pasinetti, G. M. (2009). PGC-1 $\alpha$  expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia. *Archives of Neurology*, 66(3), 352–361. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2008.588>
- Quan, Q., Qian, Y., Li, X., & Li, M. (2019). Pioglitazone reduces  $\beta$  amyloid levels via inhibition of PPAR $\gamma$  phosphorylation in a neuronal model of Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10(JUL), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00178>
- Quan, Q., Qian, Y., Li, X., Li, M., & Gou, X. (2019). CDK5 Participates in Amyloid- $\beta$  Production by Regulating PPAR $\gamma$  Phosphorylation in Primary Rat Hippocampal Neurons. *Journal of Alzheimer's Disease*, 71(2), 443–460. <https://doi.org/10.3233/JAD-190026>
- Quarta, C., Stemmer, K., Novikoff, A., Yang, B., Klingelhuber, F., Harger, A., Bakhti, M., Bastidas-Ponce, A., Baugé, E., Campbell, J. E., Capozzi, M., Clemmensen, C., Collden, G., Cota, P., Douros, J., Drucker, D. J., DuBois, B., Feuchtinger, A., Garcia-Caceres, C., ... Müller, T. D. (2022). GLP-1-mediated delivery of tesaglitazar improves obesity and glucose metabolism in male mice. *Nature Metabolism*, 4(8), 1071–1083. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00617-6>
- Racz, L. Z., Racz, C. P., Pop, L., Tomoaia, G., Mocanu, A., Barbu, I., Sárközi, M., Roman, I., Avram, A., Tomoaia-Cotisel, M., & Toma, V. (2022). Strategies for Improving Bioavailability, Bioactivity, and Physical-Chemical Behavior of Curcumin. *Molecules*, 27(20), 6854. <https://doi.org/10.3390/molecules27206854>
- Rae, C., Fekete, A. D., Kashem, M. A., Nasrallah, F. A., & Bröer, S. (2012). Metabolism, compartmentation, transport and production of acetate in the cortical brain tissue slice. *Neurochemical Research*, 37(11), 2541–2553. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0847-5>
- Rai, A., Tripathi, S., Kushwaha, R., Singh, P., Srivastava, P., Sanyal, S., & Bandyopadhyay, S. (2014). CDK5-induced p-PPAR $\gamma$ (Ser 112) downregulates GFAP via PPREs in developing rat brain: Effect of metal mixture and troglitazone in astrocytes. *Cell Death and Disease*, 5. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.514>
- Rai, S., Kamat, P. K., Nath, C., & Shukla, R. (2013). A study on neuroinflammation and NMDA receptor function in STZ (ICV) induced memory impaired rats. *Journal of Neuroimmunology*, 254(1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.08.008>
- Rai, S., Kamat, P. K., Nath, C., & Shukla, R. (2014). Glial activation and post-synaptic neurotoxicity: The key events in Streptozotocin (ICV) induced memory impairment in rats. *Pharmacology*

*Biochemistry and Behavior*, 117, 104–117. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.11.035>

- Rajasekar, N., Nath, C., Hanif, K., & Shukla, R. (2017). Intranasal Insulin Administration Ameliorates Streptozotocin (ICV)-Induced Insulin Receptor Dysfunction, Neuroinflammation, Amyloidogenesis, and Memory Impairment in Rats. *Molecular Neurobiology*, 54(8), 6507–6522. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0169-8>
- Rane, J. S., Bhaumik, P., & Panda, D. (2017). Curcumin Inhibits Tau Aggregation and Disintegrates Preformed Tau Filaments in vitro. *Journal of Alzheimer's Disease*, 60(3), 999–1014. <https://doi.org/10.3233/JAD-170351>
- Rao, Y. L., Ganaraja, B., Murlimanju, B. V., Joy, T., Krishnamurthy, A., & Agrawal, A. (2022). Hippocampus and its involvement in Alzheimer's disease: a review. *3 Biotech*, 12(2), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03123-4>
- Raut, S., Bhalerao, A., Powers, M., Gonzalez, M., Mancuso, S., & Cucullo, L. (2023). Hypometabolism, Alzheimer's Disease, and Possible Therapeutic Targets: An Overview. *Cells*, 12(16), 2019. <https://doi.org/10.3390/cells12162019>
- Ray, B., Bisht, S., Maitra, A., Maitra, A., & Lahiri, D. K. (2011). Neuroprotective and neurorescue effects of a novel polymeric nanoparticle formulation of curcumin (NanoCurc™) in the neuronal cell culture and animal model: Implications for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 23(1), 61–77. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101374>
- Reddy, P. H., Manczak, M., Yin, X., Grady, M. C., Mitchell, A., Tonk, S., Kuruva, C. S., Bhatti, J. S., Kandimalla, R., Vijayan, M., Kumar, S., Wang, R., Pradeepkiran, J. A., Ogunmokun, G., Thamarai, K., Quesada, K., Boles, A., & Reddy, A. P. (2018). Protective effects of Indian spice curcumin against Amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 61(3), 843–866. <https://doi.org/10.3233/JAD-170512>
- Rege, S. A., Arya, M., & Momin, S. A. (2019). Structure activity relationship of tautomers of curcumin: a review. *Ukrainian Food Journal*, 8(1), 45–60. <https://doi.org/10.24263/2304-974X-2019-8-1-6>
- Reich, D., Gallucci, G., Tong, M., & Dominguez, C. (2018). Therapeutic Advantages of Dual Targeting of PPAR- $\delta$  and PPAR- $\gamma$  in an Experimental Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Journal of Parkinson's Disease and Alzheimer's Disease*, 5(1), 01–08. <https://doi.org/10.13188/2376-922X.1000025>
- Reinke, A. A., & Gestwicki, J. E. (2007). Structure-activity relationships of amyloid beta-aggregation inhibitors based on curcumin: Influence of linker length and flexibility. *Chemical Biology and Drug Design*, 70(3), 206–215. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2007.00557.x>
- Rezagholidzadeh, A., Karimi, S. A., Hosseinmardi, N., Janahmadi, M., & Sayyah, M. (2022). The effects of glial cells inhibition on spatial reference, reversal and working memory deficits in a rat model of traumatic brain injury (TBI). *International Journal of Neuroscience*, 132(3), 226–236. <https://doi.org/10.1080/00207454.2020.1807544>
- Ries, M., & Sastre, M. (2016). Mechanisms of A $\beta$  clearance and degradation by glial cells. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8(JUN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00160>
- Ringman, J. M., Frautschy, S. A., Teng, E., Begum, A. N., Bardens, J., Beigi, M., Gylys, K. H., Badmaev, V., Heath, D. D., Apostolova, L. G., Porter, V., Vanek, Z., Marshall, G. A., Helleman, G., Sugar, C., Masterman, D. L., Montine, T. J., Cummings, J. L., & Cole, G. M. (2012). Oral curcumin for Alzheimer's disease: Tolerability and efficacy in a 24-week randomized, double blind, placebo-controlled study. *Alzheimer's Research and Therapy*, 4(5), 43. <https://doi.org/10.1186/alzrt146>
- Rinwa, P., Kaur, B., Jaggi, A. S., & Singh, N. (2010). Involvement of PPAR-gamma in curcumin-mediated beneficial effects in experimental dementia. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 381(6), 529–539. <https://doi.org/10.1007/s00210-010-0511-z>

- Rodrigues, Letícia, Biasibetti, R., Swarowsky, A., Leite, M. C., Quincozes-Santos, A., Quilfeldt, J. A., Achaval, M., & Goncalves, C. A. (2009). Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. *Journal of Alzheimer's Disease*, *17*(1), 193–202. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1034>
- Rodrigues, Letícia, Dutra, M. F., Ilha, J., Biasibetti, R., Quincozes-Santos, A., Leite, M. C., Marcuzzo, S., Achaval, M., & Gonçalves, C. A. (2010). Treadmill training restores spatial cognitive deficits and neurochemical alterations in the hippocampus of rats submitted to an intracerebroventricular administration of streptozotocin. *Journal of Neural Transmission*, *117*(11), 1295–1305. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0501-9>
- Rodrigues, Leticia, Wartchow, K. M., Suardi, L. Z., Federhen, B. C., Selistre, N. G., & Gonçalves, C. A. (2019). Streptozotocin causes acute responses on hippocampal S100B and BDNF proteins linked to glucose metabolism alterations. *Neurochemistry International*, *128*(March), 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.04.013>
- Rodríguez, J. J., Gardenal, E., Zallo, F., Arrue, A., Cabot, J., & Busquets, X. (2024). Astrocyte S100 $\beta$  expression and selective differentiation to GFAP and GS in the entorhinal cortex during ageing in the 3xTg-Alzheimer's disease mouse model. *Acta Histochemica*, *126*(1), 152131. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2023.152131>
- Rojas, D. B., Vizuete, A. F. K., de Andrade, V. S., de Andrade, R. B., Gemelli, T., Kim, T. D. H., Gonçalves, C. A., Leipnitz, G., & Wannmacher, C. M. D. (2023). Lipopolysaccharide impairs neurodevelopment and induces changes in astroglial reactivity, antioxidant defenses and bioenergetics in the cerebral cortex of neonatal rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *July*, 1–15. <https://doi.org/10.1002/jdn.10288>
- Romera, C., Hurtado, O., Mallolas, J., Pereira, M. P., Morales, J. R., Romera, A., Serena, J., Vivancos, J., Nombela, F., Lorenzo, P., Lizasoain, I., & Moro, M. A. (2007). Ischemic preconditioning reveals that GLT1/EAAT2 glutamate transporter is a novel PPAR $\gamma$  target gene involved in neuroprotection. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *27*(7), 1327–1338. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600438>
- Ruffin IV, M., Normolle, D. P., Heath, D., Bailey, J. M., Murray, S. I., Boggs, M., Crowell, J. A., Rock, C. L., & Brenner, D. E. (2003). *Dose escalation of curcumin in healthy adults*.
- Sahoo, B. R., Panda, P. K., Liang, W., Tang, W.-J., Ahuja, R., & Ramamoorthy, A. (2021). Degradation of Alzheimer's Amyloid- $\beta$  by a Catalytically Inactive Insulin-Degrading Enzyme. *Journal of Molecular Biology*, *433*(13), 166993. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166993>
- Salcedo, I., Tweedie, D., Li, Y., & Greig, N. H. (2012). Neuroprotective and neurotrophic actions of glucagon-like peptide-1: An emerging opportunity to treat neurodegenerative and cerebrovascular disorders. *British Journal of Pharmacology*, *166*(5), 1586–1599. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01971.x>
- Salkovic-Petrisic, M., Osmanovic-Barilar, J., Brückner, M. K., Hoyer, S., Arendt, T., & Riederer, P. (2011). Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: A long-term follow up study. *Journal of Neural Transmission*, *118*(5), 765–772. <https://doi.org/10.1007/s00702-011-0651-4>
- Samy, D. M., Ismail, C. A., Nassra, R. A., Zeitoun, T. M., & Nomair, A. M. (2016). Downstream modulation of extrinsic apoptotic pathway in streptozotocin-induced Alzheimer's dementia in rats: Erythropoietin versus curcumin. *European Journal of Pharmacology*, *770*, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.11.046>
- Sastre, M., Dewachter, I., Rossner, S., Bogdanovic, N., Rosen, E., Borghgraef, P., Evert, B. O., Dumitrescu-Ozimek, L., Thal, D. R., Landreth, G., Walter, J., Klockgether, T., Van Leuven, F., & Heneka, M. T. (2006). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress  $\beta$ -secretase gene promoter activity by the activation of PPAR $\gamma$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(2), 443–448. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503839103>

- Schuck, P. F., Tonin, A., da Costa Ferreira, G., Rosa, R. B., Latini, A., Balestro, F., Perry, M. L. S., Wannmacher, C. M. D., de Souza Wyse, A. T., & Wajner, M. (2007). In vitro effect of quinolinic acid on energy metabolism in brain of young rats. *Neuroscience Research*, *57*(2), 277–288. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2006.10.013>
- Schultz, B., Taday, J., Menezes, L., Cigerce, A., Leite, M. C., & Gonçalves, C. A. (2021). Calpain-Mediated Alterations in Astrocytes before and during Amyloid Chaos in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *84*(4), 1415–1430. <https://doi.org/10.3233/JAD-215182>
- Seady, M., Fróes, F. T., Gonçalves, C. A., & Leite, M. C. (2023). Curcumin modulates astrocyte function under basal and inflammatory conditions. *Brain Research*, *1818*(August). <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2023.148519>
- Searcy, J. L., Phelps, J. T., Pancani, T., Kadish, I., Popovic, J., Anderson, K. L., Beckett, T. L., Murphy, M. P., Chen, K.-C., Blalock, E. M., Landfield, P. W., Porter, N. M., & Thibault, O. (2012). Long-Term Pioglitazone Treatment Improves Learning and Attenuates Pathological Markers in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *30*(4), 943–961. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-111661>
- Seargent, J. M., Yates, E. A., & Gill, J. H. (2004). GW9662, a potent antagonist of PPARgamma, inhibits growth of breast tumour cells and promotes the anticancer effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone, independently of PPARgamma activation. *British Journal of Pharmacology*, *143*(8), 933–937. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705973>
- Selistre, N. G., Rodrigues, L., Federhen, B. C., Gayger-Dias, V., Taday, J., Wartchow, K. M., & Gonçalves, C.-A. (2023). S100B Secretion in Astrocytes, Unlike C6 Glioma Cells, Is Downregulated by Lactate. *Metabolites*, *14*(1), 7. <https://doi.org/10.3390/metabo14010007>
- Seminotti, B., Amaral, A. U., Grings, M., Ribeiro, C. A. J., Leipnitz, G., & Wajner, M. (2020). Lipopolysaccharide-Elicited Systemic Inflammation Induces Selective Vulnerability of Cerebral Cortex and Striatum of Developing Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficient (Gcdh  $-/-$ ) Mice to Oxidative Stress. *Neurotoxicity Research*, *38*(4), 1024–1036. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00291-0>
- Seok, H., Lee, M., Shin, E., Yun, M. R., Lee, Y. ho, Moon, J. H., Kim, E., Lee, P. H., Lee, B. W., Kang, E. S., Lee, H. C., & Cha, B. S. (2019). Low-dose pioglitazone can ameliorate learning and memory impairment in a mouse model of dementia by increasing LRP1 expression in the hippocampus. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40736-x>
- Šerý, O., Povová, J., Míšek, I., Pešák, L., & Janout, V. (2013). Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: A review. *Folia Neuropathologica*, *51*(1), 1–9. <https://doi.org/10.5114/fn.2013.34190>
- Shah, B. H., Nawaz, Z., Pertani, S. A., Roomi, A., Mahmood, H., Saeed, S. A., & Gilani, A. H. (1999). Inhibitory effect of curcumin, a food spice from turmeric, on platelet-activating factor- and arachidonic acid-mediated platelet aggregation through inhibition of thromboxane formation and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Biochemical Pharmacology*, *58*(7), 1167–1172. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00206-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00206-3)
- Shang, X. L., Wang, Q. B., Liu, X. P., Yao, X. Q., Cao, F. Y., Wang, Q., Zhang, J. Y., Wang, J. Z., & Liu, G. P. (2015). Fluorocitrate induced the alterations of memory-related proteins and tau hyperphosphorylation in SD rats. *Neuroscience Letters*, *584*, 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.10.036>
- Shao, S., Ye, X., Su, W., & Wang, Y. (2023). Curcumin alleviates Alzheimer's disease by inhibiting inflammatory response, oxidative stress and activating the AMPK pathway. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *134*(August), 102363. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2023.102363>
- Sharifi-Rad, M., Lankatillake, C., Dias, D. A., Docea, A. O., Mahomoodally, M. F., Lobine, D., Chazot, P. L., Kurt, B., Tumer, T. B., Moreira, A. C., Sharopov, F., Martorell, M., Martins, N., Cho, W. C., Calina, D., & Sharifi-Rad, J. (2020). Impact of natural compounds on

- neurodegenerative disorders: From preclinical to pharmacotherapeutics. *Journal of Clinical Medicine*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/jcm9041061>
- Sharma, R. A., Euden, S. A., Platton, S. L., Cooke, D. N., Shafayat, A., Hewitt, H. R., Marczylo, T. H., Morgan, B., Hemingway, D., Plummer, S. M., Pirmohamed, M., Gescher, A. J., & Steward, W. P. (2004). Phase I clinical trial of oral curcumin: Biomarkers of systemic activity and compliance. *Clinical Cancer Research*, 10(20), 6847–6854. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0744>
- Sharma, R. A., Steward, W. P., & Gescher, A. J. (2007). PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS OF CURCUMIN. In *Multifunctional Nanocarriers* (pp. 453–470). [https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_20)
- Shi, D. Y., Bierhaus, A., Nawroth, P. P., & Stern, D. M. (2009). RAGE and Alzheimer's disease: A progression factor for amyloid- $\beta$ - induced cellular perturbation? *Journal of Alzheimer's Disease*, 16(4), 833–843. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1030>
- Siddiqui, N., Ali, J., Parvez, S., Najmi, A. K., & Akhtar, M. (2023). Neuroprotective Role of DPP-4 Inhibitor Linagliptin Against Neurodegeneration, Neuronal Insulin Resistance and Neuroinflammation Induced by Intracerebroventricular Streptozotocin in Rat Model of Alzheimer's Disease. *Neurochemical Research*, 48(9), 2714–2730. <https://doi.org/10.1007/s11064-023-03924-w>
- Silvestro, S., Sindona, C., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2021). A state of the art of antioxidant properties of curcuminoids in neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 1–26. <https://doi.org/10.3390/ijms22063168>
- Singh, Baljinder, Day, C. M., Abdella, S., & Garg, S. (2024). Alzheimer's disease current therapies, novel drug delivery systems and future directions for better disease management. *Journal of Controlled Release*, 367(January), 402–424. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.01.047>
- Singh, Birdavinder, Sharma, B., Jaggi, A. S., & Singh, N. (2013). Attenuating effect of lisinopril and telmisartan in intracerebroventricular streptozotocin induced experimental dementia of Alzheimer's disease type: Possible involvement of PPAR- $\gamma$  agonistic property. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 14(2), 124–136. <https://doi.org/10.1177/1470320312459977>
- Singh, S., Sahu, K., Singh, C., & Singh, A. (2022). Lipopolysaccharide induced altered signaling pathways in various neurological disorders. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 395(3), 285–294. <https://doi.org/10.1007/s00210-021-02198-9>
- Sobue, A., Komine, O., & Yamanaka, K. (2023). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: microglial signature and their relevance to disease. *Inflammation and Regeneration*, 43(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s41232-023-00277-3>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Sood, A., Preeti, K., Fernandes, V., Khatri, D. K., & Singh, S. B. (2021). Glia: A major player in glutamate–GABA dysregulation-mediated neurodegeneration. *Journal of Neuroscience Research*, 99(12), 3148–3189. <https://doi.org/10.1002/jnr.24977>
- Soria Lopez, J. A., González, H. M., & Léger, G. C. (2019). Alzheimer's disease. *Handbook of Clinical Neurology*, 167, 231–255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3>
- Sorrenti, V., Contarini, G., Sut, S., Dall'Acqua, S., Confortin, F., Pagetta, A., Giusti, P., & Zusso, M. (2018). Curcumin prevents acute neuroinflammation and long-term memory impairment induced by systemic lipopolysaccharide in mice. *Frontiers in Pharmacology*, 9(MAR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00183>
- Sozio, M. S., Lu, C., Zeng, Y., Liangpunsakul, S., & Crabb, D. W. (2011). Activated AMPK inhibits PPAR- $\alpha$  and PPAR- $\gamma$  transcriptional activity in hepatoma cells. *American Journal of Physiology*

- *Gastrointestinal and Liver Physiology*, 301(4). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00432.2010>
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J. M., Rhee, J., Jäger, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., Simon, D. K., Bachoo, R., & Spiegelman, B. M. (2006). Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. *Cell*, 127(2), 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.024>
- Stanojevic, J. B., Zeljkovic, M., Dragic, M., Stojanovic, I. R., Ilic, T. V., Stevanovic, I. D., & Ninkovic, M. B. (2023). Intermittent theta burst stimulation attenuates oxidative stress and reactive astrogliosis in the streptozotocin-induced model of Alzheimer’s disease-like pathology. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 15(May), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1161678>
- Stephenson, J., Nutma, E., van der Valk, P., & Amor, S. (2018). Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology*, 154(2), 204–219. <https://doi.org/10.1111/imm.12922>
- Storer, P. D., Xu, J., Chavis, J., & Drew, P. D. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists inhibit the activation of microglia and astrocytes: Implications for multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 161(1–2), 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.12.015>
- Sun, J., Zhang, X., Wang, C., Teng, Z., & Li, Y. (2017). Curcumin Decreases Hyperphosphorylation of Tau by Down-Regulating Caveolin-1/GSK-3 $\beta$  in N2a/APP695swe Cells and APP/PS1 Double Transgenic Alzheimer’s Disease Mice. *American Journal of Chinese Medicine*, 45(8), 1667–1682. <https://doi.org/10.1142/S0192415X17500902>
- Swanson, R. A., & Graham, S. H. (1994). Fluorocitrate and fluoroacetate effects on astrocyte metabolism in vitro. *Brain Research*, 664(1–2), 94–100. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91958-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91958-5)
- Taday, J., Frões, F. T., Seady, M., Gonçalves, C. A., & Leite, M. C. (2024). In Vitro Astroglial Dysfunction Induced by Neurotoxins: Mimicking Astrocytic Metabolic Alterations of Alzheimer’s Disease. *Metabolites*, 14(3), 151. <https://doi.org/10.3390/metabo14030151>
- Takikawa, M., Kurimoto, Y., & Tsuda, T. (2013). Curcumin stimulates glucagon-like peptide-1 secretion in GLUTag cells via Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435(2), 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.04.092>
- Tang, M., Taghibiglou, C., & Liu, J. (2017). The Mechanisms of Action of Curcumin in Alzheimer’s Disease. *Journal of Alzheimer’s Disease*, 58(4), 1003–1016. <https://doi.org/10.3233/JAD-170188>
- Thomazi, A. P., Godinho, G. F. R. S., Rodrigues, J. M., Schwalm, F. D., Frizzo, M. E. S., Moriguchi, E., Souza, D. O., & Wofchuk, S. T. (2004). Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: Sensitivity to guanosine. *Mechanisms of Ageing and Development*, 125(7), 475–481. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.04.005>
- Toba, J., Nikkuni, M., Ishizeki, M., Yoshii, A., Watamura, N., Inoue, T., & Ohshima, T. (2016). PPAR $\gamma$  agonist pioglitazone improves cerebellar dysfunction at pre-A $\beta$  deposition stage in APPswe/PS1dE9 Alzheimer’s disease model mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 473(4), 1039–1044. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.04.012>
- Tony Wyss, C. (2016). Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature*, 10(539), 180–186. <https://doi.org/10.1038/nature20411>. Ageing
- Tramontina, A. C., Wartchow, K. M., Rodrigues, L., Biasibetti, R., Quincozes-Santos, A., Bobermin, L., Tramontina, F., & Gonçalves, C.-A. (2011). The neuroprotective effect of two statins: simvastatin and pravastatin on a streptozotocin-induced model of Alzheimer’s disease in rats. *Journal of Neural Transmission*, 118(11), 1641–1649. <https://doi.org/10.1007/s00702-011-0680-z>
- Tramontina, F., Leite, M. C., Cereser, K., de Souza, D. F., Tramontina, A. C., Nardin, P., Andreazza, A. C., Gottfried, C., Kapczinski, F., & Gonçalves, C. A. (2007). Immunoassay for glial fibrillary

- acidic protein: Antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *Journal of Neuroscience Methods*, 162(1–2), 282–286. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.01.001>
- Ullah, F., Gamage, R., Sen, M. K., & Gyengesi, E. (2022). The Effects of Modified Curcumin Preparations on Glial Morphology in Aging and Neuroinflammation. *Neurochemical Research*, 47(4), 813–824. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03499-4>
- Ullah, R., & Lee, E. J. (2023). Advances in Amyloid- $\beta$  Clearance in the Brain and Periphery: Implications for Neurodegenerative Diseases. *Experimental Neurobiology*, 32(4), 216–246. <https://doi.org/10.5607/en23014>
- Valles, S. L., Dolz-Gaiton, P., Gambini, J., Borrás, C., Lloret, A., Pallardo, F. V., & Viña, J. (2010). Estradiol or genistein prevent Alzheimer's disease-associated inflammation correlating with an increase PPAR $\gamma$  expression in cultured astrocytes. *Brain Research*, 1312, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.11.044>
- Vassar, R., Kuhn, P. H., Haass, C., Kennedy, M. E., Rajendran, L., Wong, P. C., & Lichtenthaler, S. F. (2014). Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: Current status and future prospects. *Journal of Neurochemistry*, 130(1), 4–28. <https://doi.org/10.1111/jnc.12715>
- Vizuete, A. F. K., Fróes, F., Seady, M., Zanotto, C., Bobermin, L. D., Roginski, A. C., Wajner, M., Quincozes-Santos, A., & Gonçalves, C. A. (2022). Early effects of LPS-induced neuroinflammation on the rat hippocampal glycolytic pathway. *Journal of Neuroinflammation*, 19(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02612-w>
- Vizuete, A. F. K., Hansen, F., Da Ré, C., Leal, M. B., Galland, F., Conclite Leite, M., & Gonçalves, C. A. (2019). GABA A Modulation of S100B Secretion in Acute Hippocampal Slices and Astrocyte Cultures. *Neurochemical Research*, 44(2), 301–311. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2675-8>
- Wahlstrom, B., & Blennow, G. (1978). Study on Fate of Curcumin in Rat. *Acta Pharmacologica Et Toxicologica*, 43(2), 86–92.
- WANG, D., & BORDEY, A. (2008). The astrocyte odyssey. *Progress in Neurobiology*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.09.015>
- Wang, H. M., Zhao, Y. X., Zhang, S., Liu, G. D., Kang, W. Y., Tang, H. D., Ding, J. Q., & Chen, S. Di. (2010). PPAR $\gamma$  agonist curcumin reduces the amyloid- $\beta$ -stimulated inflammatory responses in primary astrocytes. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(4), 1189–1199. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-091336>
- Wang, J., Guo, M. N., Liu, Z. Z., Ma, S. F., Liu, W. J., Qian, J. J., & Zhang, W. N. (2021). PGC-1 $\alpha$  reduces Amyloid- $\beta$  deposition in Alzheimer's disease: Effect of increased VDR expression. *Neuroscience Letters*, 744(August 2020), 135598. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135598>
- Wang, L.-M., Wu, Q., Kirk, R. A., Horn, K. P., Ebada Salem, A. H., Hoffman, J. M., Yap, J. T., Sonnen, J. A., Towner, R. A., Bozza, F. A., Rodrigues, R. S., & Morton, K. A. (2018). Lipopolysaccharide endotoxemia induces amyloid- $\beta$  and p-tau formation in the rat brain. *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 8(2), 86–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29755842> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5944824>
- Wang, M., Wang, B., Wang, S., Lu, H., Wu, H., Ding, M., Ying, L., Mao, Y., & Li, Y. (2021). Effect of Quercetin on Lipids Metabolism Through Modulating the Gut Microbial and AMPK/PPAR Signaling Pathway in Broilers. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(February), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.616219>
- Wang, P., Su, C., Feng, H., Chen, X., Dong, Y., Rao, Y., Ren, Y., Yang, J., Shi, J., Tian, J., & Jiang, S. (2017). Curcumin regulates insulin pathways and glucose metabolism in the brains of APP<sup>swE</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 30(1), 25–43. <https://doi.org/10.1177/0394632016688025>
- Wang, R., Li, Y. B., Li, Y. H., Xu, Y., Wu, H. li, & Li, X. J. (2008). Curcumin protects against

- glutamate excitotoxicity in rat cerebral cortical neurons by increasing brain-derived neurotrophic factor level and activating TrkB. *Brain Research*, 1210, 84–91.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.01.104>
- Wang, Y. S., & White, T. D. (1999). The bacterial endotoxin lipopolysaccharide causes rapid inappropriate excitation in rat cortex. *Journal of Neurochemistry*, 72(2), 652–660.  
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0720652.x>
- Wang, Yipeng, & Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(1), 5–21. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1>
- Wang, Yun, Ni, J., Zhai, L., Gao, C., Xie, L., Zhao, L., & Yin, X. (2019). Inhibition of activated astrocyte ameliorates lipopolysaccharide- induced depressive-like behaviors. *Journal of Affective Disorders*, 242, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.08.015>
- Warden, A., Truitt, J., Merriman, M., Ponomareva, O., Jameson, K., Ferguson, L. B., Mayfield, R. D., & Harris, R. A. (2016). Localization of PPAR isotypes in the adult mouse and human brain. *Scientific Reports*, 6(May), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep27618>
- Wei, X., Ke, B., Zhao, Z., Ye, X., Gao, Z., & Ye, J. (2014). Regulation of insulin degrading enzyme activity by obesity-associated factors and pioglitazone in liver of diet-induced obese mice. *PLoS ONE*, 9(4), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095399>
- Willem, M., Tahirovic, S., Busche, M. A., Ovsepijan, S. V., Chafai, M., Kootar, S., Hornburg, D., Evans, L. D. B., Moore, S., Daria, A., Hampel, H., Müller, V., Giudici, C., Nuscher, B., Wenninger-Weinzierl, A., Kremmer, E., Heneka, M. T., Thal, D. R., Giedraitis, V., ... Haass, C. (2015).  $\sigma$ -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature*, 526(7573), 443–447. <https://doi.org/10.1038/nature14864>
- Wilson, D. M., Cookson, M. R., Van Den Bosch, L., Zetterberg, H., Holtzman, D. M., & Dewachter, I. (2023). Hallmarks of neurodegenerative diseases. *Cell*, 186(4), 693–714.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.12.032>
- Wyss-Coray, T., Loike, J. D., Brionne, T. C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., Silverstein, S. C., & Husemann, J. (2003). Adult mouse astrocytes degrade amyloid- $\beta$  in vitro and in situ. *Nature Medicine*, 9(4), 453–457. <https://doi.org/10.1038/nm838>
- Xin, S. H., Tan, L., Cao, X., Yu, J. T., & Tan, L. (2018). Clearance of Amyloid Beta and Tau in Alzheimer's Disease: from Mechanisms to Therapy. *Neurotoxicity Research*, 34(3), 733–748.  
<https://doi.org/10.1007/s12640-018-9895-1>
- Yamada, M., Ono, K., Hamaguchi, T., & Noguchi-Shinohara, M. (2015). Natural phenolic compounds as therapeutic and preventive agents for cerebral amyloidosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 863, 79–95. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-18365-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-18365-7_4)
- Yamamoto, N., Ishikuro, R., Tanida, M., Suzuki, K., Ikeda-Matsuo, Y., & Sobue, K. (2018). Insulin-signaling Pathway Regulates the Degradation of Amyloid  $\beta$ -protein via Astrocytes. *Neuroscience*, 385, 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.06.018>
- Yamamoto, N., Nakazawa, M., Nunono, N., Yoshida, N., Obuchi, A., Tanida, M., Suzuki, K., Ikeda-Matsuo, Y., & Sobue, K. (2020). Protein kinases A and C regulate amyloid- $\beta$  degradation by modulating protein levels of neprilysin and insulin-degrading enzyme in astrocytes. *Neuroscience Research*, May 2020. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2020.05.008>
- Yang, H., Zeng, F., Luo, Y., Zheng, C., Ran, C., & Yang, J. (2022). Curcumin Scaffold as a Multifunctional Tool for Alzheimer's Disease Research. *Molecules*, 27(12), 1–19.  
<https://doi.org/10.3390/molecules27123879>
- Yang, S., Chen, Z., Cao, M., Li, R., Wang, Z., & Zhang, M. (2017). Pioglitazone ameliorates A $\beta$ 42 deposition in rats with diet-induced insulin resistance associated with AKT/GSK3 $\beta$  activation. *Molecular Medicine Reports*, 15(5), 2588–2594. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6342>



- Yoshida, H., Okumura, N., Nishimura, Y., Kitagishi, Y., & Matsuda, S. (2011). Turmeric and curcumin suppress presenilin 1 protein expression in jurkat cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2(4), 629–632. <https://doi.org/10.3892/etm.2011.246>
- Zetterberg, H., & Mattsson, N. (2014). Understanding the cause of sporadic Alzheimer's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 14(6), 621–630. <https://doi.org/10.1586/14737175.2014.915740>
- Zhang, H., Song, B., Zhu, W., Liu, L., He, X., Wang, Z., An, K., Cao, W., Shi, J., & Wang, S. (2021). Glucagon-like peptide-1 attenuated carboxymethyl lysine induced neuronal apoptosis via peroxisome proliferation activated receptor- $\gamma$ . *Aging*, 13(14), 1–15. <https://doi.org/10.18632/aging.203351>
- Zhang, H. Y., Wang, Y., He, Y., Wang, T., Huang, X. H., Zhao, C. M., Zhang, L., Li, S. W., Wang, C., Qu, Y. N., & Jiang, X. X. (2020). A1 astrocytes contribute to murine depression-like behavior and cognitive dysfunction, which can be alleviated by IL-10 or fluorocitrate treatment. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01871-9>
- Zhang, J., Zheng, Y., Luo, Y., Du, Y., Zhang, X., & Fu, J. (2019). Curcumin inhibits LPS-induced neuroinflammation by promoting microglial M2 polarization via TREM2/TLR4/NF- $\kappa$ B pathways in BV2 cells. *Molecular Immunology*, 116(September), 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.09.020>
- Zhang, Laura, Fiala, M., Cashman, J., Sayre, J., Espinosa, A., Mahanian, M., Zaghi, J., Badmaev, V., Graves, M. C., Bernard, G., & Rosenthal, M. (2006). Curcuminoids enhance amyloid- $\beta$  uptake by macrophages of Alzheimer's disease patients. *Journal of Alzheimer's Disease*, 10(1), 1–7. <https://doi.org/10.3233/JAD-2006-10101>
- Zhang, Li, Yang, S., Wong, L. R., Xie, H., & Ho, P. C. L. (2020). In vitro and in vivo comparison of curcumin-encapsulated chitosan-coated poly (lactic- co-glycolic acid) nanoparticles and curcumin/Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin inclusion complexes administered intranasally as therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Molecular Pharmaceutics*, 17(11), 4256–4269. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00675>
- Zhang, M. J., Zhong, J. H., & Yi, X. J. (2023). Effect of Curcumin on Cognitive Behavior and Pathological Characteristics of the Hippocampus in Mice with Inherent Alzheimer's Disease. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 175(3), 335–340. <https://doi.org/10.1007/s10517-023-05863-6>
- Zhang, X., Shen, X., Dong, J., Liu, W. C., Song, M., Sun, Y., Shu, H., Towse, C. L., Liu, W., Liu, C. F., & Jin, X. (2019). Inhibition of Reactive Astrocytes with Fluorocitrate Ameliorates Learning and Memory Impairment Through Upregulating CRTG1 and Synaptophysin in Ischemic Stroke Rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 39(8), 1151–1163. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00709-0>
- Zheng, K., Dai, X., Xiao, N., Wu, X., Wei, Z., Fang, W., Zhu, Y., Zhang, J., & Chen, X. (2017). Curcumin Ameliorates Memory Decline via Inhibiting BACE1 Expression and  $\beta$ -Amyloid Pathology in 5xFAD Transgenic Mice. *Molecular Neurobiology*, 54(3), 1967–1977. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9802-9>
- Zolezzi, J. M., Santos, M. J., Bastías-Candia, S., Pinto, C., Godoy, J. A., & Inestrosa, N. C. (2017). PPARs in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroinflammation. *Biological Reviews*, 92(4), 2046–2069. <https://doi.org/10.1111/brv.12320>

## Anexo I – Carta de aprovação da comissão no uso de animais do capítulo I



**UFRGS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
Comissão De Ética No Uso De Animais



### **CARTA DE APROVAÇÃO**

**Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:**

**Número:** 34855

**Título:** Efeito de indutores de características iniciais da doença de Alzheimer sobre as enzimas de degradação do peptídeo  $\beta$ -amilóide em astrócitos

**Vigência:** 13/04/2018 à 29/02/2020

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

MARINA CONCLI LEITE - coordenador desde 13/04/2018  
CARLOS ALBERTO SARAIVA GONCALVES - pesquisador desde 13/04/2018  
FERNANDA CAROLINA TELLES DA SILVA FRÓES - Aluno de Doutorado desde 13/04/2018  
JÉSSICA HAUSCHILD TADAY - Aluno de Mestrado desde 13/04/2018  
MARINA PEDRA SEADY - Aluno de Mestrado desde 13/04/2018

*Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 03/09/2018 - Sala 330 do Anexo I do Prédio da Reitoria - Campus Centro - Av. Paulo Gama-100/ Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 126 ratos neonatos (1-4 dias de idade, machos ou fêmeas) oriundos do Depto de Bioquímica/UFRGS; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.*

Porto Alegre, Terça-Feira, 18 de Setembro de 2018

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA  
Vice Coordenador da comissão de ética

## Anexo II – Carta de aprovação da comissão no uso de animais do capítulo II

	<b>UFRGS</b> UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	<b>PRÓ-REITORIA DE PESQUISA</b> Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:**

**Número:** 40242  
**Título:** INVESTIGACAO DOS EFEITOS DA CURCUMINA EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE ALZHEIMER INDUZIDO POR ESTEPTOZOTOCINA E SEUS MECANISMOS MOLECULARES EM CULTURA DE ASTROCITOS

**Vigência:** 01/04/2021 à 31/03/2024

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

MARINA CONCLI LEITE - coordenador desde 01/04/2021  
JÉSSICA HAUSCHILD TADAY - desde 01/04/2021  
CARLOS ALBERTO SARAIVA GONCALVES - pesquisador desde 01/04/2021

*Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 17/05/2021 - Reunião via webconferência - Mconf UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 125 ratos Wistar machos neonatos e de 518 ratos Wistar machos de 90 dias, provenientes do biotério setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.*

Porto Alegre, Sexta-Feira, 28 de Maio de 2021

  
ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA  
Coordenador da comissão de ética