

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**CRISTINI ESCOBAR VIANA**

**EFEITO NEUROPROTETOR DO VINHO RUBY CABERNET SOBRE O PREJUÍZO  
DE MEMÓRIA EM CAMUNDONGOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

**Uruguaiana, RS, Brasil**

**2018**

**CRISTINI ESCOBAR VIANA**

**EFEITO NEUROPROTETOR DO VINHO RUBY CABERNET SOBRE O PREJUÍZO  
DE MEMÓRIA EM CAMUNDONGOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestra em Bioquímica**.

Orientador: **Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse**

Coorientadora: **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marina Prigol**

**Uruguaiana, RS, Brasil**

**2018**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

V614e Viana, Cristini Escobar  
EFEITO NEUROPROTETOR DO VINHO RUBY CABERNET SOBRE O  
PREJUÍZO DE MEMÓRIA EM CAMUNDONGOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS /  
Cristini Escobar Viana.  
85 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Pampa,  
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2018.

"Orientação: Cristiano Ricardo Jesse".

1. Compostos fenólicos. 2. Déficit cognitivo. 3. Dieta com  
elevado índice de colesterol. 4. Camundongos nocaute para  
receptor LDLr-/- . 5. Neuroplasticidade. I. Título.

CRISTINI ESCOBAR VIANA

EFEITO NEUROPROTETOR DO VINHO RUBY CABERNET SOBRE O PREJUÍZO  
DE MEMÓRIA EM CAMUNDONGOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestra em Bioquímica**.

Dissertação defendida e aprovada em: 11 de Abril de 2018.

Banca examinadora



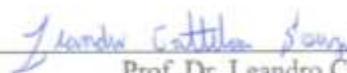
---

Prof.ª Dr.ª Maria Prigol  
Co-orientadora  
(UNIPAMPA)



---

Prof. Dr. Gustavo Petri Guerra  
(UNIPAMPA)



---

Prof. Dr. Leandro Cattelan Souza  
(UNIPAMPA)

## **GRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por fortalecer minha caminhada e por proporcionar a realização desta meta a muito desejada.

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Cristiano Ricardo Jesse, por toda a atenção e ensinamentos conferidos a mim. Que Deus o proteja e ilumine em uma ótima recuperação.

À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marina Prigol, pela disponibilidade, atenção e ensinamentos nesta etapa tão importante do trabalho. Muito obrigada!

Ao LaftamBio Pampa, por me receber e oferecer o suporte necessário nesta etapa de estudos.

À minha família, minha mãe Dadânea, meu irmão Cristiano e ao meu pai Homero por serem incansáveis na compreensão e exímios motivadores. Obrigada família!

E agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo. Ao PPG-Bioquímica e UNIPAMPA pela oportunidade para a concretização de mais esta etapa da minha caminhada acadêmica.

**Muito Obrigada!**

## RESUMO

A hipercolesterolemia se caracteriza pela elevação patológica da taxa de colesterol sanguínea aumentando a formação de radicais livres, o qual provoca oxidação e danos nos lipídios celulares causando crescimento da atividade inflamatória e progressão negativa da função cognitiva. O consumo de vinho tinto atua minimizando estes efeitos, inibindo a expressão de citocinas e modulando os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), da proteína cíclica de ligação ao elemento AMPc-resposta (CREB), dos microRNAs (miARN), e a ação da enzima acetilcolinesterase (AChE). Os antioxidantes, os flavonóides e os polifenóis tornaram-se as primeiras substâncias contidas no vinho tinto com efeitos benéficos comprovados em várias doenças, como a inibição da oxidação de LDL e parâmetros envolvidos na resposta inflamatória. A ingestão regular de bebidas ricas em polifenóis demonstra exercer consequências favoráveis à saúde humana, como diminuição da incidência de doenças cardiovasculares, câncer e proteção contra doenças neurodegenerativas, entre outras. Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar o potencial efeito neuroprotetor do vinho Ruby Carbenet em camundongos nocaute para o receptor LDLr<sup>-/-</sup> expostos à dieta hipercolesterolêmica. O vinho foi submetido a análise em *vitro* para quantificação de polifenóis, antocianinas, ácido cafeico, ácido gálico, epicatequina e resveratrol. Foram utilizados 40 camundongos adultos com 90 dias, de 20 a 25 gramas. Os animais foram divididos em 4 grupos (n=10) e para a indução da hipercolesterolemia foi borrifado colesterol diluído em álcool puro 96° C, sobre a dieta comercial (Puro Trato PB 22) durante 90 dias. Ao final do tratamento foi realizado teste comportamental de memória, tarefa do labirinto aquático de Morris (MWM), logo após, o sangue foi coletado por punção cardíaca e o córtex pré-frontal e o hipocampo foram removidos para os ensaios bioquímicos. Foram determinados os níveis de lipídios plasmáticos e as citocinas pró-inflamatórias, interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-6 (IL-6) no hipocampo e córtex pré-frontal. Também foram avaliadas a atividade da AChE e os níveis das proteínas estruturais BDNF e CREB, e os biomarcadores microRNAs. Nossos resultados mostraram que a dieta hipercolesterolêmica causa um aumento nos lipídios plasmáticos, nas citocinas pró-inflamatórias e na atividade da enzima AChE nos camundongos LDLr<sup>-/-</sup>, o que foi atenuado pelo consumo de vinho tinto através da diminuição do estado inflamatório. A dieta com elevado índice de colesterol diminuiu os níveis de BDNF, CREB e microRNAs cerebrais, e o consumo moderado de vinho tinto foi capaz de reverter estas proteínas estruturais BDNF e CREB, e os biomarcadores miRNA146a e 155, promovendo a neuroproteção e a melhora da memória. O vinho Ruby Cabernet apresentou potencial antioxidante confirmado pelos seus teores de ácido gálico 135, 3 mg/L, ácido caféico 91,2 mg/L, epicatequina 242,2 mg/L e resveratrol 102,2 mg/L. O consumo moderado do vinho proporcionaram aos camundongos melhora no déficit cognitivo e plasticidade, corroborando com o resultado do teste comportamental, no qual o MWM está relacionado com o sistema de aprendizado e memória. Com isso, verificou-se que o vinho Ruby Carbenet demonstrou efeito neuroprotetor e reduziu os níveis dos lipídios plasmáticos, modulando as citocinas, agindo na manutenção da neuroplasticidade e regulação da atividade da acetilcolinesterase em camundongos hipercolesterolêmicos.

Palavras-chave: Compostos fenólicos. Déficit cognitivo. Dieta com elevado índice de colesterol. Camundongos nocaute para receptor LDLr<sup>-/-</sup>. Neuroplasticidade.

## ABSTRACT

Hypercholesterolemia is characterized by the pathological elevation of the blood cholesterol level, increasing the formation of free radicals, which causes oxidation and damage to the cellular lipids causing inflammatory activity growth and negative progression of cognitive function. Red wine consumption minimizes these effects by inhibiting cytokine expression and modulating levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), cyclic cAMP-binding element (CREB), microRNAs (miRNA), and the action of the enzyme acetylcholinesterase (AChE). Antioxidants, flavonoids and polyphenols have become the first substances contained in red wine with proven beneficial effects in various diseases, such as the inhibition of LDL oxidation and parameters involved in the inflammatory response. Regular ingestion of polyphenol-rich beverages has a positive effect on human health, such as reducing the incidence of cardiovascular diseases, cancer and protection against neurodegenerative diseases, among others. Therefore, the present study aimed to investigate the potential neuroprotective effect of Ruby Carbenet wine in knockout mice for the  $Ldlr^{-/}$  receptor exposed to the hypercholesterolemic diet. The wine was submitted to in vitro analysis for quantification of polyphenols, anthocyanins, caffeic acid, gallic acid, epicatechin and resveratrol. 40 adult mice with 90 days, from 20 to 25 grams were used. The animals were divided into 4 groups (n=10) and for the induction of hypercholesterolemia cholesterol was diluted in pure alcohol 96 ° C, on the commercial diet (Puro Trato PB 22) for 90 days. At the end of the treatment was performed memory behavioral test, Morris water maze task (MWMT), soon after, blood was collected by cardiac puncture and the prefrontal cortex and hippocampus were removed for biochemical assays. The levels of plasma lipids and proinflammatory cytokines, interferon gamma ( $IFN-\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  ( $TNF-\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  ( $IL-1\beta$ ) and interleukin-6 ( $IL-6$ ) in the hippocampus and prefrontal cortex. We also evaluated the activity of AChE and the levels of the structural proteins BDNF and CREB, and the biomarkers microRNAs. Our results showed that the hypercholesterolemic diet causes an increase in plasma lipids, proinflammatory cytokines and AChE enzyme activity in  $Ldlr^{-/}$  mice, which was attenuated by the consumption of red wine through the reduction of the inflammatory state. The high cholesterol diet decreased levels of BDNF, CREB and brain microRNAs, and moderate consumption of red wine was able to revert these structural proteins BDNF and CREB, and the miRNA146a and 155 biomarkers, promoting neuroprotection and the improvement of memory. Ruby Cabernet wine showed antioxidant potential confirmed by its content of gallic acid 135.3 mg/L, caffeic acid 91.2 mg/L, epicatechin 242.2 mg/L and resveratrol 102.2 mg/L. The moderate consumption of wine gave the mice an improvement in cognitive deficit and plasticity, corroborating with the result of the behavioral test, in which MWMT is related to the learning and memory system. Thus, it was verified that Ruby Carbenet wine demonstrated neuroprotective effect and reduced plasma lipid levels, modulating cytokines, acting to maintain neuroplasticity and regulate acetylcholinesterase activity in hypercholesterolemic mice.

Keywords: Phenolic compounds. Cognitive deficit. Diet with high cholesterol. Knockout mice for  $Ldlr^{-/}$  receptor. Neuroplasticity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do colesterol .....	13
Figura 2 – Mecanismo de ação BDNF-CREB-microRNA .....	19
Figura 3 – Região da Campanha, Rio Grande do Sul .....	22
Figura 4 – Uva e vinho Ruby Cabernet .....	22
Figura 5 – Estrutura química do resveratrol .....	23
Figura 6 – Estrutura química da epicatequina .....	24



## LISTA DE ABREVIATURAS

AChE – Acetilcolinesterase

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*)

BSA – Área de superfície corporal

CREB – Proteína cíclica de ligação ao elemento AMPc-resposta

CEUA – Comissão de Ética de Uso de Animais

HDL – Lipoproteína de alta densidade

IDL – Lipoproteína de densidade intermediária

IL-1 $\beta$  – Interleucina-1 $\beta$

IL-6 – Interleucina-6

IFN- $\gamma$  – Interferon gama

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LDLr<sup>-/-</sup> - receptor LDL

MWMT – Labirinto aquático de Morris

miRNAs – microRNAs

OMS – Organização Mundial da Saúde

ROS – Espécie reativa de oxigênio

SNC – Sistema nervoso central

TC – Colesterol Total

TG – Triglicerídeos

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral- $\alpha$

VLDL – Lipoproteínas de muita baixa densidade

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>13</b>
2.1 Hypercolesterolemia	13
2.2 Animais nocaute para receptor LDLr <sup>-/-</sup>	15
2.3 Hipercolesterolemia versus efeitos neurológicos	16
2.4 Memória	17
2.5 Neuroinflamação	18
2.6 Vinho	20
2.7 Constituintes do vinho	23
2.8 Efeitos neuroprotetor do vinho	25
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	<b>28</b>
<b>4 OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
4.1 Objetivo geral	29
4.2 Objetivo específico	29
<b>5 MANUSCRITO CIENTÍFICO</b>	<b>30</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>69</b>
<b>7 PERSPECTIVAS</b>	<b>70</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>71</b>
<b>9 ANEXO</b>	<b>85</b>

## APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO** está descrita uma breve revisão de literatura sobre os temas abordados nesta dissertação seguida pelo item **OBJETIVOS**.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico, os quais são apresentados no item **MANUSCRITO CIENTÍFICO**. As seções: *Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas*, encontra-se no próprio artigo e representa a íntegra deste estudo. O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica “*European Journal of Pharmacology*” para a qual foi submetido.

Os itens **CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS** encontram-se no final desta dissertação e apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo contido neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens introdução e revisão bibliográfica.

## 1 INTRODUÇÃO

A hipercolesterolemia, anomalia crônica e metabólica, caracterizada pelas alterações patológicas dos lipídios séricos, apresenta elevação persistente dos níveis de colesterol total (TC), lipoproteína de baixa densidade (LDL), triglicerídeos (TG) e diminuição de lipoproteína de alta densidade (HDL) no sangue (TIWARI e KHOKHAR, 2014; MAILER et al., 2017), também é comumente citada como dieta com elevados índices de colesterol, desencadeando o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a vulnerabilidade em condições inflamatórias através de vários mecanismos patogênicos. (KERTÉSZ et al., 2013). Estima-se que 48% da população das Américas nos últimos anos, apresentaram aumento nas concentrações totais de colesterol sanguíneo, estabelecendo valores acima de 190 mg / dL, analisado em 39% de adultos com idade acima de 25 anos (WHO).

Estudos epidemiológicos indicam que o aumento exacerbado do colesterol apresenta um importante fator de risco para a demência na vida adulta, pois desencadeiam alterações bioquímicas e comportamentais ligadas a déficit de aprendizado e memória, referentes a doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (MOREIRA et al., 2014). A este respeito, demonstra-se que a hipercolesterolemia afeta a integridade da estrutura cerebral, contribuindo para a neurodegeneração através da produção de citocinas pro-inflamatórias e radicais livres (THIRUMANGALAKUDI et al., 2008), este ciclo inflamatório oxidativo acarreta neuroinflamação e leva à danos ao hipocampo e córtex pré-frontal induzindo déficits nos processos de cognição (EVOLA et al., 2010; RAMALINGAM e KIM 2012).

Além disso, a hipercolesterolemia interfere negativamente no fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), na proteína de ligação do elemento de resposta ao AMPc (CREB), e nos biomarcadores microRNAs (miARN), desencadeando declínio progressivo das funções neurológicas. (LI et al., 2015). Tendo em vista esses danos, pesquisadores têm buscado alternativas para minimizar tais efeitos nocivos à saúde e o vinho tinto por conter diversos compostos com potencial antioxidante e por estar presente na mesa do consumidor se sobressai como escolha viável (RODRIGO, MIRANDA e VERGARA, 2011).

O vinho é uma bebida alcoólica tradicional de amplo valor comercial, obtido da fermentação do mosto da uva. No entanto, a qualidade do vinho pode ser caracterizada pela distribuição geográfica dos vinhedos, pela diferenciação das vinha, técnicas de vinificação e envelhecimento (MARKOSKI et al., 2016). Com isso, os vinhos produzidos no Rio Grande do Sul demonstram elevado índice de qualidade, pois as regiões exibem condições edafoclimáticas adequadas, agregando à matéria prima, produção de metabólitos secundários,

como taninos, polifenóis e antocianinas, o que define a qualidade peculiar do vinho e agrega importância farmacológica à variedade (TOMAZETTI et al., 2015).

Desta forma, a cidade de Itaqui, RS, na emergente região vinícola da Campanha Oriental desenvolveu a produção da cepa híbrida do Ruby Cabernet, bem adaptada à região, pois expressa videiras mais tolerantes a climas mais quentes, demonstrando rentabilidade elevada e o vinho evidencia índices positivos de compostos fenólicos indicando proteção contra a hipercolesterolemia (BRIXNER et al., 2010; DE OLIVEIRA et al., 2014; TOMAZETTI et al., 2015).

Os compostos bioativos associados ao vinho tinto, ácido cafeico, epicatequina, resveratrol, agem positivamente aos mediadores inflamatórios, como as citocinas, aumentando os níveis do mecanismo microRNA-CREB-BDNF e diminuindo a ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) (WANG et al., 2016), como também, causa aumento da função cognitiva e plasticidade sináptica, em processos de aprendizado e memória (ZHAO et al., 2013; EL-KADER & AL-JIFFRI, 2016). A atividade reduzida da AChE, que é uma enzima responsável por modular os níveis de acetilcolina na fenda sináptica, desencadeia uma melhora dos sintomas clínicos da doença de Alzheimer, retardando temporariamente o declínio da função cognitiva e capacidade funcional dos indivíduos, podendo estes efeitos estar relacionado aos flavonoides presentes no vinho tinto (GOMES & KOSZUOSKI, 2005).

O consumo moderado de vinho tinto nos remete a benefícios neuroprotetores, uma vez que a uva contém resveratrol, um polifenol natural com ação antioxidante, anti-inflamatória e anti-envelhecimento, que expressa capacidade de modular sinergicamente variados alvos moleculares, propondo maior eficácia terapêutica nas patologias relacionadas à memória (CARUANA; CAUCHI & VASSALLO, 2016).

Devido à possibilidade de explorar os benefícios do vinho tinto Ruby Carbenet pelo seu valor nutricional e funcional, e sua comprovada aplicabilidade farmacológica, vinculada aos seus compostos polifenólicos, faz-se necessário um estudo sobre a ingestão moderada desta bebida acerca de sua ação neuroprotetora em camundongos expostos a dieta hipercolesterolêmica.

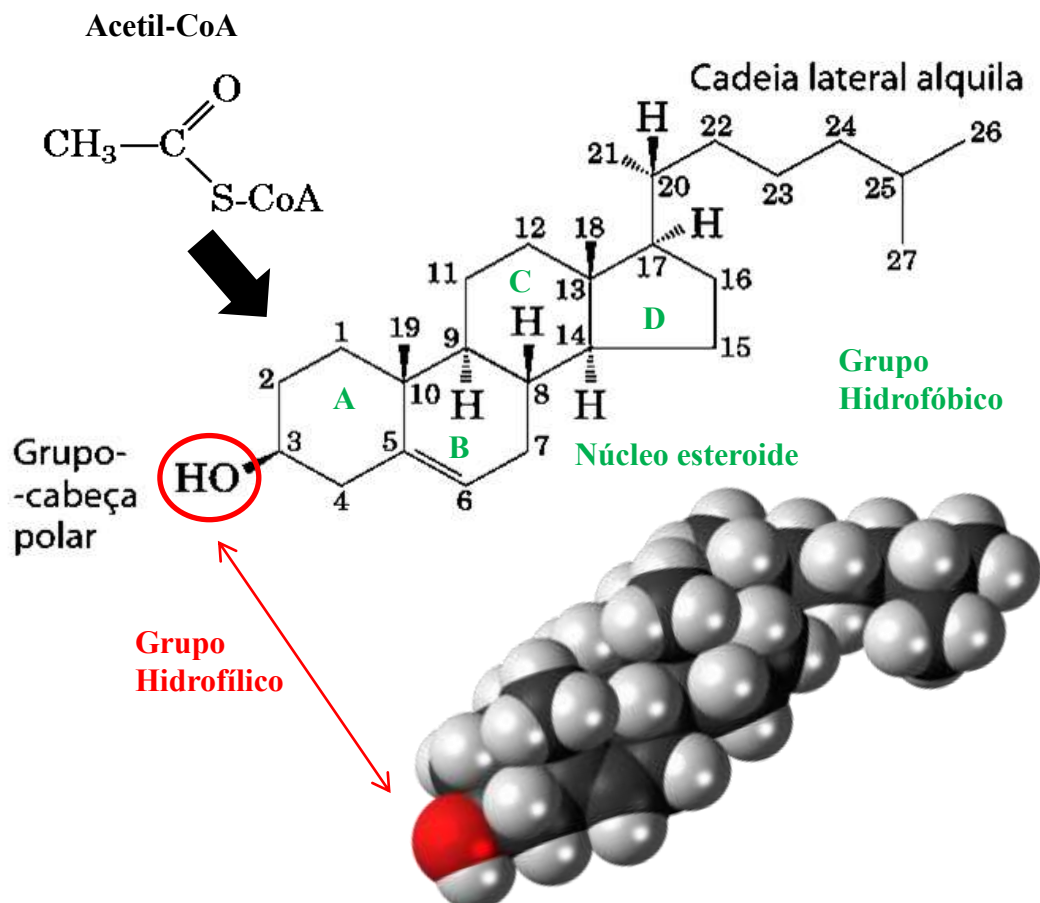
A hipótese estabelecida para a presente dissertação se baseia na prevalência da hipercolesterolemia em grande parte da população, e as consequências neurodegenerativas ligadas a memória causadas por esta disfunção, se torna relevante a busca por alternativas viáveis e com menores efeitos colaterais, para o tratamento destas patologias causadas pelo aumento dos lipídios sanguíneos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Hipercolesterolemia

O colesterol é um componente indispensável do corpo humano e é caracterizado como uma molécula orgânica anfipática, que tem uma região hidrofílica com um grupo hidroxila no carbono 3 (cabeça polar) e uma região hidrofóbica no carbono 17 (cadeia lateral apolar) do esteroide núcleo planar de 4 anéis (GROULEFF et al., 2015) (Figura 1). As moléculas de colesterol possuem várias funções fisiológicas, a partir do componente fundamental das membranas plasmáticas em todas as células animais (MANCINI et al., 2014), como precursor de hormônios esteróides, sais biliares e vitamina D (GOLDSTEIN; BROWN, 1990), bem como ter um papel fundamental na plasticidade e transmissão sináptica (PFRIEGER, 2003). Devido à sua importância, todas as células são capazes de sintetizar a partir da acetil-coenzima A (acetil-CoA) (Figura 1), portanto, não é necessário que esteja presente na dieta de mamíferos (MANCINI, 2017).

**Figura 1** – Estrutura química do colesterol.



Fonte: arquivo próprio (2017) adaptado de Nelson e Cox (2011).

Durante o estado fisiológico basal dos animais adultos, o fígado excreta diariamente uma quantidade de colesterol que corresponde à mesma quantidade que é sintetizada nos tecidos adicionados com o colesterol da ingestão alimentar (MANCINI et al., 2014). Quando a soma do colesterol sintetizado e que obteve da dieta excede a quantidade necessária, ou seja, quando há uma desregulação no metabolismo do colesterol, pode ocorrer um aumento da concentração plasmática de colesterol, caracterizando um estado de hipercolesterolemia (GROULEFF et al., 2015). O excesso de colesterol plasmático se acumula nas paredes das artérias formando placas volumosas que reduzem o fluxo sanguíneo, o que pode obstruir vasos de pequeno calibre e causar infarto agudo do miocárdio e em alguns casos, podendo levar ao acidente vascular cerebral (HANSSON; HERMANSSON, 2011).

A hipercolesterolemia, identificada pela elevação patológica da taxa de colesterol no sangue, induz lesões celulares e alterações moleculares, exercendo papel central na iniciação e progressão de placas de aterosclerose (MAILER et al., 2017). Além disso, provoca o estresse oxidativo, formação em grande escala de espécies reativas de oxigênio (ROS) e incidência de marcadores inflamatórios, como as citocinas, podendo causar câncer, doença cardiovascular, diabetes mellitus e doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (CHIU et al., 2016).

Evidências emergentes destacam a hipercolesterolemia familiar como uma doença genética do metabolismo das lipoproteínas cujo modo de herança é autossômica codominante, esta doença é caracterizada por níveis muito elevados de colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e pela presença de sinais clínicos característicos, como os xantomas do tendão e o aumento do risco de doença arterial coronariana (MANCINI, 2017; MAILER et al., 2017).

A transição nutricional que atinge a população mundial ocorreu de forma impactante, principalmente nas últimas décadas (TRAIL et al., 2014). O perfil da desnutrição foi substituído pelo consumo excessivo de alimentos. As dietas tradicionais foram substituídas por alimentos ultraprocessados que possuem maior disponibilidade e praticidade de consumo. No entanto, esses alimentos são ricos em carboidratos refinados, gorduras de origem animal, conservantes, corantes, entre outros ingredientes que dão origem ao elevado índice de obesos na sociedade em geral (TRAIL et al., 2014). O alto conteúdo de gorduras presentes nos alimentos atualmente consumidos favorece a ocorrência de um desequilíbrio na homeostase lipídica, o que facilita o desenvolvimento de hipercolesterolemia e, portanto, promove condições patológicas, como doenças cardiovasculares e neuronais (WEBER; NOELS, 2011; MANCINI, 2017).

Com isso, a procura por opções clínicas para o tratamento da hipercolesterolemia em geral obteve significativo aumento, o uso de fármacos como a estatina, que promove a inibição da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase), enzima limitante da síntese do colesterol, pode causar efeitos colaterais adversos com danos musculares e fraqueza, levando à descontinuidade do medicamento (XAVIER et al., 2013). Desta forma, os cientistas buscam alternativas para o tratamento da hipercolesterolemia utilizando variados fármacos, produtos naturais, bem como optar por mudanças no estilo de vida (PALMA et al., 2015). Para maximizar as opções de tratamento da hipercolesterolemia, vem sendo muitas vezes utilizado um modelo de animal nocaute para receptor LDLr<sup>-/-</sup>, que são amplamente empregados em estudos genéticos e fisiológicos, já que compartilham aspectos semelhantes às lesões ateroscleróticas humanas (ZADELAAR et al., 2007).

## **2.2 Animais knockout para receptor LDLr<sup>-/-</sup>**

Os camundongos LDLr<sup>-/-</sup>, desenvolvidos por Ishibashi et al. (1991), são reconhecidos como modelos de hipercolesterolemia familiar humana (MANCINI, 2017). Quando submetidos a uma dieta padrão, os camundongos LDLr<sup>-/-</sup> apresentam hipercolesterolemia, caracterizados por níveis moderados de colesterol LDL, e podem desenvolver lesões ateroscleróticas a longo prazo (MANCINI, 2017). No entanto, quando alimentados com uma dieta rica em colesterol, eles se tornam estritamente hipercolesterolêmicos com o desenvolvimento de intensa aterosclerose aórtica e xantomas subcutâneos, possuindo também maior susceptibilidade à neurotoxicidade (ISHIBASHI et al., 1993; MANCINI, 2017). Algumas características deste modelo animal podem ser vantajosas, como a similaridade com a condição humana da hipercolesterolemia causada por mutações no gene para o receptor de LDLr<sup>-/-</sup>; e o perfil de lipoproteínas plasmáticas, que é semelhante ao dos humanos, com a maioria do colesterol confinado à fração LDL (ISHIBASHI et al., 1993; ZADELAAR et al., 2007).

Em um estudo realizado por Mancini et al. (2014), os camundongos LDLr<sup>-/-</sup> apresentaram níveis de colesterol plasmático até 2 vezes maiores do que os níveis plasmáticos de camundongos de tipo selvagem, independentemente da idade desses animais. Verificou-se também que os camundongos hipercolesterolêmicos apresentaram diminuição do teor de glutatona na aorta, que se correlacionou negativamente com os níveis plasmáticos de colesterol, indicando uma relação entre hipercolesterolemia e complicações vasculares em LDLr<sup>-/-</sup> (MANCINI et al., 2014). A glutatona se caracteriza por apresentar potencial



antioxidante intracelular mais abundante no organismo, protegendo o metabolismo fisiológico do corpo contra danos oxidativos (ALEMANY, 2013; MACINI et al., 2014).

O uso de camundongos nocaute de receptores LDLr<sup>-/-</sup> hipercolesterolêmicos, vem se tornando uma ferramenta útil para o estudo do impacto dos altos níveis de colesterol circulante em parâmetros metabólicos e funcionais em diferentes órgãos (ZADELAAR et al., 2007). O surgimento de camundongos geneticamente modificados é de suma importância para o desenvolvimento de estudos científicos, pois auxiliam na descoberta de soluções vinculadas a problemas relacionados a estudos experimentais como a hipercolesterolemia e a aterosclerose (MENDES e DE JESUS SOUZA, 2017).

### **2.3 Hipercolesterolemia versus efeitos neurológicos**

A hipercolesterolemia está associada ao comprometimento da função cerebral, particularmente a disfunção cognitiva (KANG et al., 2015) e redução do número de neurônios ativos, mediada por neuroinflamação aumentada (ALSUHAYMI et al., 2017). Além disso, o elevado nível de colesterol plasmático desencadeia uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) em estrutura cerebral como o córtex pré-frontal, originando prejuízo oxidativo paralelo ao dano na sinalização colinérgica correlacionado aos processos de aprendizagem e memória (THIRUMANGALAKUDI et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2014). Em modelos experimentais com roedores jovens as implicações da dieta rica em gordura acerca da cognição e memória são consideradas consequências da elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como interferon gama, fator de necrose tumoral- $\alpha$  e interleucinas caracterizando coeficientes de inflamação cerebral (BOITARD et al., 2014).

A desregulação das citocinas pró-inflamatórias no organismo desencadeiam processos oxidativos e contribuem para o comprometimento cognitivo desencadeando a neuroinflamação que podem acarretar em doenças como o Alzheimer (DE LA MONTE e TONG, 2014). Estudos anteriores demonstra que camundongos nocautes LDLr<sup>-/-</sup> hipercolesterolêmicos submetidos a testes comportamentais, apresentaram déficit nos processos de aprendizagem e memória (MOREIRA et al., 2012). Hipótese relevante se baseia no fato de que alterações lipídicas plasmáticas estão fortemente correlacionadas com patologias neurológicas como o risco do desenvolvimento de deficiências cognitivas leves e demência (ETTCHETO et al., 2015).

As evidências sugerem que atualmente a prevalência de sobrepeso e obesidade na população vem aumentando, as estatísticas demonstram que aproximadamente 600 milhões de

peças em todo o mundo apresentam esta disfunção metabólica (ROBSTAD, SÖDERHAMN e FEGRAN, 2018), estas estimativas estão intimamente ligadas a problemas neurodegenerativos como a doença de Alzheimer, que incide em mais de 46,8 milhões de pacientes com disfunção neuronal e perda de memória, estatística crescente desde 2015 (KOTHARI et al., 2017).

## 2.4 Memória

A memória é considerada uma função cognitiva muito complexa, e evidências científicas sugerem que o aprendizado e o seu armazenamento podem sofrer alterações estruturais no sistema nervoso devido a modificações metabólicas no organismo (DALMAZ E NETTO, 2004). Associações entre os efeitos neurotóxicos da obesidade e as anormalidades no hipocampo vem sendo avaliadas devido ao processo inflamatório incorporado ao excesso de colesterol plasmático, o que prejudica essa estrutura cerebral, trazendo consequências negativas como as doenças neurodegenerativas (FOTUHI, DO e JACK, 2012).

As doenças relacionadas a distúrbio neurodegenerativo são caracterizadas por perda de conexões sinápticas dentro de regiões cerebrais seletivas, ocasionando prejuízos relacionados à obtenção e retenção da memória, estas patologias como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson acometem um número crescente de pessoas, interferindo assim, na qualidade de vida desses indivíduos (SÁ et al., 2012).

Neste contexto, estudos com camundongos relatam a influência da hipercolesterolemia nos prejuízos cognitivos comprovados por testes comportamentais como o labirinto aquático de Morris, labirinto em cruz elevada e campo aberto, e por aumento da neuroinflamação (THIRUMANGALAKUDI et al., 2008). Corrobora pesquisa com ratos hipercolesterolêmicos com sistema colinérgico prejudicado e evidências de déficits de memória (ULLRICH, PIRCHL e HUMPEL, 2010). Assim como, a correlação positiva entre níveis elevados de colesterol no plasma, estresse oxidativo e déficits cognitivos em camundongos nocaute de receptores LDLr<sup>-/-</sup> (DE OLIVEIRA et al., 2011). As descobertas científicas relacionam a hipercolesterolemia com disfunção cognitiva potencialmente mediada por aumento da neuroinflamação (PUIG et al., 2012).

Vários estudos atuais sugerem que aproximadamente 14 milhões de americanos terão doença de Alzheimer até meados deste século e ainda existem dúvidas sobre a melhor abordagem terapêutica, prevenção ou tratamento (PASINETTI 2012). Com isso, pesquisas levantam a hipótese de adicionar polifenóis de produtos derivados da uva à dieta, enfatizando

seu papel neuroprotetor (RAMESH et al., 2010). Do mesmo modo, evidências experimentais salientam que o vinho tinto agregado aos seus compostos fenólicos pode proteger contra os danos advindos de doenças cognitivas (CARUANA; CAUCHI e VASSALLO, 2016).

## 2.5 Neuroinflamação

A inflamação é uma resposta fisiológica do organismo ao dano tecidual, se caracteriza por uma sucessão de reações químicas coordenadas, assim como produção de citocinas, estas reações fazem parte da resposta imune inata do corpo, ou seja, isola o tecido danificado e promove respostas imunes (CHAUVEAU et al., 2008). O sistema nervoso central (SNC) possui a barreira hematoencefálica, dito como "privilégio imunológico", porém possui capacidade limitada de regeneração e exibe redução na capacidade de eliminação de radicais livres, podendo em caso de inflamação originar a morte neuronal (BAILEY et al., 2006).

A neuroinflamação consiste na ocorrência de um complexo processo inflamatório no tecido neuronal, em condições patológicas acarreta doenças autoimunes como esclerose múltipla e doenças neurodegenerativas como o Alzheimer (WYSS-CORAY, 2006). A participação das citocinas pró-inflamatórias nos processos de neuroinflamação, que está intimamente ligada a atividade neural, resulta em manifestação de características que mimetizam doenças neurológicas (VEZZANI et al., 2016). Por outro lado, a neuroinflamação pode ser considerada um processo benéfico envolvido na manutenção da homeostase de órgãos e a resposta cerebral a infecções ou lesões (GLASS et al., 2010).

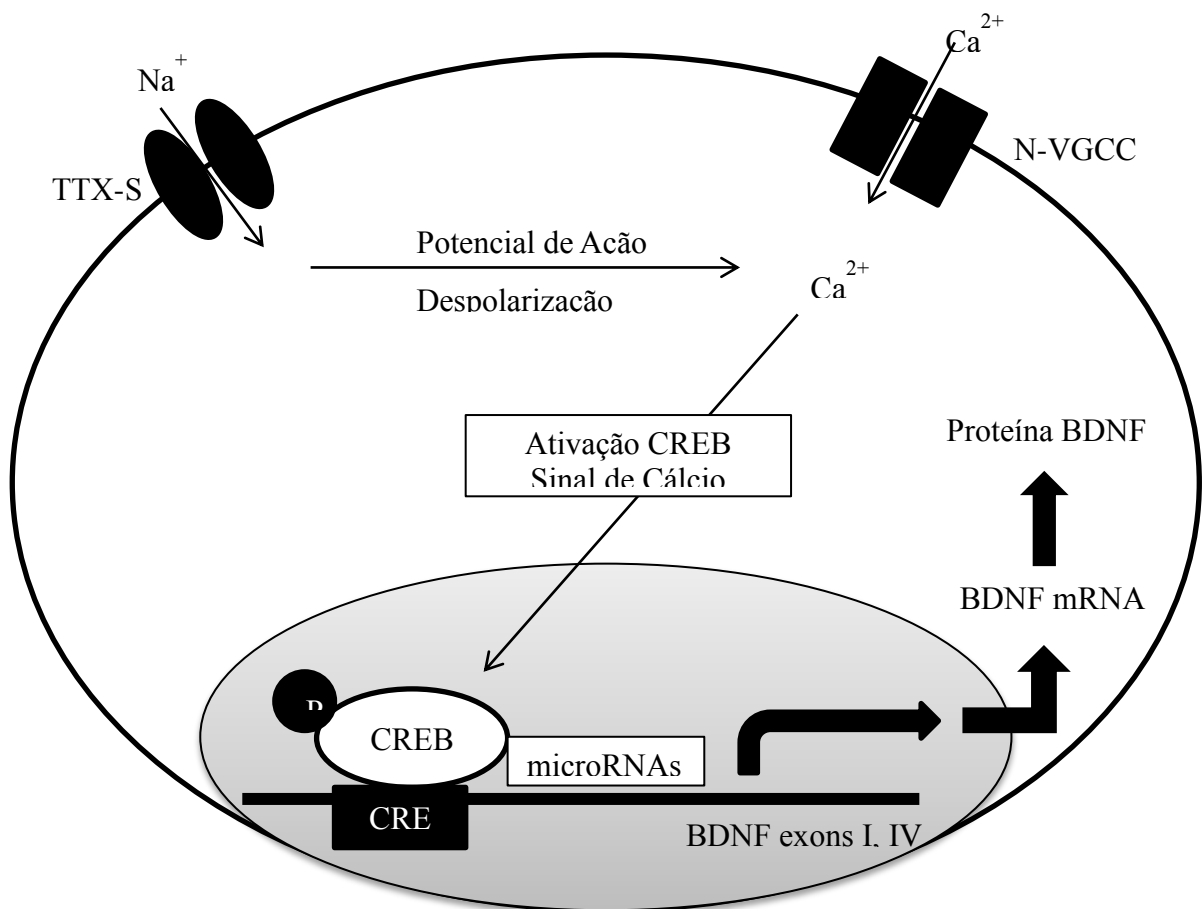
O SNC também possui a capacidade de se recuperar e se reestruturar das suas propriedades morfológicas e funcionais em resposta as alterações do ambiente, habilidade esta, denominada plasticidade neural (NUDO, 2003), na presença de lesões o SNC procura recuperar ou fortalecer funções perdidas, como formar novas conexões sinápticas (LEVIN, 2003). Após o processo de injúria cerebral, como no caso de isquemia, os genes de recuperação e plasticidade são ativados, dentre estes o BDNF (brain derived neurotrophic factor, fator neurotrófico derivado do cérebro) que atua em resposta ao dano (WIELOCH e NIKOLICH, 2006). Outro mecanismo muito estudado são as vias de ação do BDNF que participa da integração das respostas celulares em neuroplasticidade e neuroinflamação (ZAGREBELSKY e KORTE, 2014).

O BDNF é uma neurotrofina relacionada à sobrevivência neuronal e age como modulador crucial da plasticidade sináptica nas estruturas cerebrais, com maior relevância no hipocampo, localizada no lobo temporal medial, considerado vital para o aprendizado,

memória e navegação espacial (GONÇALVES, TOMAZ e SANGOI, 2008). Pesquisas demonstram que os níveis séricos de BDNF se apresentam diminuído em pacientes com transtorno depressivo comparados com controles saudáveis (KAREGE et al., 2002). Além disso, outro estudo relata que a diminuição da expressão de BDNF está associada à redução da plasticidade sináptica e a atrofia neuronal (BRUNONI, LOPES e FREGNI, 2008).

Descreve-se que os eventos regulatórios para a ativação do BDNF nos neurônios corticais são dependentes de um fator de transcrição implicado no controle de respostas adaptativas denominado CREB e a elevação do íon cálcio no meio intracelular (Figura 2) (MARTINEZ-LEVY e CRUZ-FUENTES, 2014). O CREB é um fator de transcrição que se liga às regiões promotoras de muitos genes associados à aprendizagem, memória e à plasticidade sináptica (ETTCHETO et al., 2015). Sendo também manipulado pelo processo neuroinflamatório advindo da desregulação das citocinas pró-inflamatórias originárias de uma dieta rica em gordura e elevado índice de colesterol sérico (MOLTENI et al., 2004).

**Figura 2** – Mecanismo de ação BDNF-CREB-microRNA.



Outro fator relevante que atua na regulação da expressão gênica, no metabolismo celular e estão envolvidos na formação da resposta imune são os MicroRNAs (miRNAs), pequenas moléculas de RNA não codificantes (cerca de 22 nucleótidos) (POY, SPRANGER e STOFFEL, 2007). Os microRNAs são considerados biomarcadores prognósticos, suas mudanças de expressão ou função pode estar associada a vários distúrbios do SNC, pois participam de várias etapas do desenvolvimento sináptico, como a dendritogênese, formação e maturação das sinapses (YI et al., 2014). Estudos relatam que existe relação entre microRNA e o BDNF nos processos neuronais (NUMAKAWA et al., 2011).

O miRNA-146a se caracteriza na suposta regulação negativa da resposta inflamatória inata, assim como no progresso funcional em infecções e doenças humanas, este biomarcador pode ser usado para o diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças. (LI, CHEN e LI, 2010). Este miRNA-146a também regula negativamente a expressão de interleucina (IL-8) associado ao crescimento nos processos inflamatórios de macrófagos (LIU et al., 2010). Evidências emergentes descrevem que o miRNA-155 pode estar diretamente relacionado a uma variedade de mediadores inflamatórios (O'CONNELL et al., 2010). A expressão aumentada deste microRNA está associado com o aumento da liberação de citocinas durante o processo inflamatório (CEPPI et al., 2009). Estudos relataram que o miR-146a e o miR-155 são altamente expressos em fibroblasto sinovial de artrite reumatóide em comparação com osteoartrite fibroblastos, demonstrando relação entre inflamação, imunidade inata e expressão de miRNA (NIIMOTO et al., 2010).

Com isso percebe-se que os processos inflamatórios e o aumento das citocinas estão vinculados na expressão negativa do mecanismo microRNA-CREB-BDNF (NUMAKAWA et al., 2011; MARTINEZ-LEVY e CRUZ-FUENTES, 2014; LI et al., 2015).

## **2.6 Vinho**

O vinho é uma bebida alcoólica proveniente da modificação biológica da uva, onde durante a fermentação várias reações químicas geradas por leveduras agem sobre os açúcares da uva, decompondo-os em álcool (PRADO et al., 2013). São ricos em polifenóis, que representam um grande conjunto de fitoquímicos com variadas propriedades antioxidantes, assim como, ações anti-inflamatórias, hipotensoras, anticoagulantes e anticarcinogênicas (ESTRUCH et al., 2004). O teor de polifenóis varia com o tipo de uva, distribuição geográfica dos vinhedos, técnicas de vinificação e envelhecimento, bem como o manejo do solo e condições climáticas (MARKOSKI et al., 2016).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a ingestão diária de vinho em níveis moderados de consumo deve expressar uma quantidade máxima de três doses-padrão de 120 mL para homens e duas para mulheres, cálculo baseado no método de normalização da área de superfície corporal (BSA), que se correlaciona bem em várias espécies de mamíferos em vários parâmetros da biologia (REAGAN-SHAW, NIHAL & AHMAD 2008; PRADO et al., 2013).

A expansão da vitivinicultura no Rio Grande do Sul foi estabelecida em meados da década de 1980 com a participação dos italianos que se estabeleciam no local naquela época, principalmente na Serra Gaúcha e na região Central (SUSIN, 2003). Com a globalização econômica, surgiram tecnologias mais modernas de vinificação e a extensão da produção de vinho abarcou as regiões da Serra, do Sudoeste e da Campanha gaúcha, que nos trouxe novos aromas, cores e sabores para o vinho (SUSIN, 2003).

Com isso, a produção vinícola no Rio Grande do Sul agrega ao país, vinhos de elevada qualidade, pois as regiões disponibilizam solo, clima e água necessários para proporcionar condições adequadas de cultivo, agregando a matéria prima maior quantidade de metabólitos secundários, como taninos e polifenóis, responsáveis pela sua importância farmacológica (TOMAZETTI et al., 2015). Dentre as principais regiões produtoras de vinhos finos, a Região da Campanha se destaca por possuir clima subtropical, o que favorece o acúmulo de polifenóis (TONIETTO et al., 2012). Desta forma, a cidade de Itaqui, RS, na região da Fronteira Oeste, vem implantando vinhedos com mudas importadas da França e da Itália, bem adaptadas à região demonstram níveis elevados de compostos bioativos e compostos polifenólicos, agregando capacidade antioxidante aos produtos vinícolas (PAZZINI et al., 2015). Algumas das principais variedades de uvas cultivadas nesta região para produção de vinhos tintos são: Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Ruby Cabernet, Tannat, Tempranillo e Pinot Noir (TONIETTO et al., 2012).

O município de Itaqui, na emergente região vinícola da Campanha Oriental (Figura 3) desenvolveu o cultivo da uva Ruby Cabernet (Figura 4), uma cepa híbrida e bem adaptada ao clima quente da região, demonstrando quantidade positiva de compostos fenólicos como o resveratrol, taninos, ácido gálico e epicatequina o que propicia seu potencial antioxidante (BRIXNER et al., 2010; DE OLIVEIRA et al., 2014; TOMAZETTI et al., 2015). Esta ação antioxidante característica dos favoráveis níveis de compostos fenólicos presentes na matéria prima, juntamente com suas propriedades organolépticas advindas da região e do processo de vinificação é que agregam ao vinho rentabilidade e atividade farmacológica (CARBÓ et al., 1999).

**Figura 3** – Região da Campanha, Rio Grande do Sul.



Fonte: arquivo próprio (2018).

**Figura 4** – Uva e vinho Ruby Cabernet.



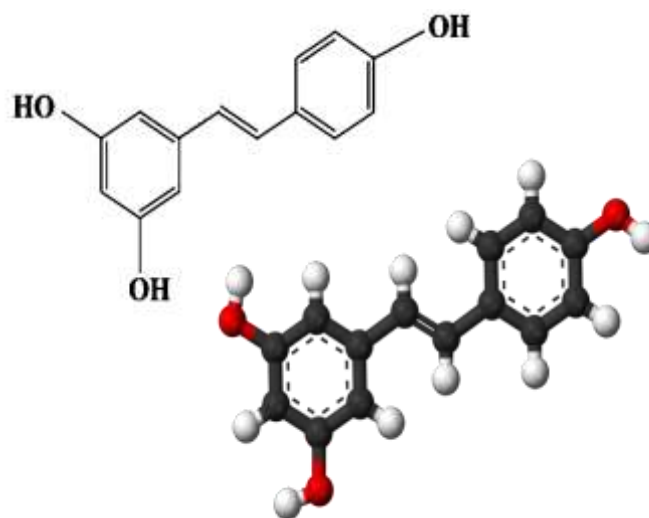
Fonte: arquivo próprio (2018).

## 2.7 Constituintes do Vinho

O vinho possui variabilidade em seus compostos fenólicos devido a diferença de espécies, origem e processamento da uva. O conteúdo de polifenóis presentes no vinho se dividem em dois grupos denominados flavonóides e não flavonóides, isso ocorre devido a similaridade de suas cadeias de átomos de carbonos (COVAS et al., 2010). Também possuem em sua constituição, ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido cafeico, ácido p-coumarico, etc.), stilbenos (trans-resveratrol), flavonóides (catequina, epicatequina, quercetina, rutina, miricetina, etc.) (XIANG et al., 2014). Sendo o resveratrol, um não flavonóide, considerado o composto mais estudado na uva e em seus derivados, devido aos seus numerosos benefícios em processos fisiológicos (WALLERATH et al., 2002).

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) (Figura 5) é sintetizado na casca da uva, desta forma sua disponibilidade depende do ataque fúngico no processo de fermentação do vinho, bem como o cultivo da uva, origem geográfica e práticas enológicas, o que também estabelece quantidade distinta deste composto nos tipos de vinhos (FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012). O resveratrol abrange múltiplos mecanismos de ação que talvez estejam relacionados aos seus benefícios à saúde, incluindo propriedades como antienvhecimento, anticarcinogênico, anti-inflamatório e antioxidante (SMOLIGA, BAUR e HAUSENBLAS, 2011). Este composto descrito como fitonutriente está presente em maior quantidade no vinho tinto e possui propriedades funcionais que podem agir prevenindo ou retardando a progressão de uma variedade de doenças, como dano cardiovascular, lesões isquêmicas, processos de inflamação e câncer (WALLERATH et al., 2002).

**Figura 5** – Estrutura química do resveratrol

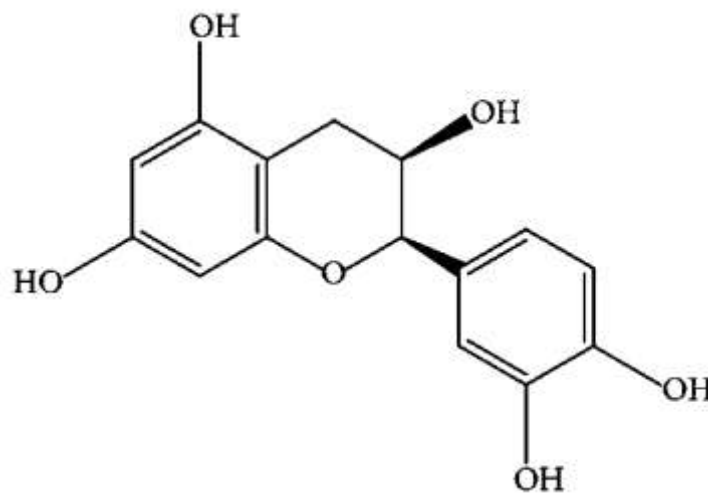


Fonte: arquivo próprio (2017) adaptado de Lee et al. (2013).



A epicatequina ( $C_{15}H_{14}O_6$ ) (Figura 6) foi analisada em extratos de vinho tinto, semente e pele de uva (*Vitis vinifera*) e apresentou benefícios antioxidantes agindo na redução do estresse oxidativo sérico e na eliminação de radicais livres (DELCAMBRE e SAUCIER, 2012; DE ROSSO et al., 2015). Assim como o ácido gálico presente na semente de uvas que contribuem com mais de 26% na habilidade de sequestrar radicais livres (YILMAZ e TOLEDO, 2004; ROESLER et al., 2007). O ácido cafeico em estudos anteriores demonstra atividade inibitória da oxidação de LDL *in vitro* isolada de frações antioxidantes de vinho tinto (ABU-AMSHA et al., 1996), em *ex vivo* o ácido cafeico é verificado no plasma, podendo expressar atividade antioxidante (CACCETTA et al., 2000). Estes compostos fenólicos, epicatequina, ácido gálico e o ácido cafeico possuem características antioxidantes verificadas em diversos tipos de vinhos analisados em estudos anteriores (GARCÍA-FALCÓN et al., 2007; FANZONE et al., 2012; VAN LEEUW et al., 2014; PAZZINI et al., 2015).

**Figura 6** – Estrutura química da epicatequina



Fonte: arquivo próprio (2017) adaptado de Rozza et al. (2012).

Outro importante polifenol pertencente a uva são as antocianinas, responsáveis pela cor vermelha dos vinhos, pois são removidas da casca de uva no decorrer do processo de vinificação (MARKOSKI et al., 2016). As concentrações de antocianinas no vinho tinto são de grande interesse nutricional, pois possuem potencial antioxidante, capacidade antineoplásica, anti-inflamatória, antiviral e antibacteriana (PEDRESCHI e CISNEROS-ZEVALLOS, 2007).

Os polifenóis são os principais compostos fenólicos extraídos de uvas durante o processo de vinificação e são responsáveis pelas propriedades sensoriais dos vinhos (SIES,

2010). O conteúdo total de polifenóis no vinho proporciona uma possível estimativa do seu potencial antioxidante, pois em diversos estudos os compostos fenólicos agem na redução de lesões aterosclerótica e no estresse oxidativo, bem como na agregação plaquetária e eventos de isquemia (FUHRMAN, et al., 2005; RODRIGO, MIRANDA e VERGARA, 2011; GARCÍA-GUZMÁN et al., 2015).

## **2.8 Efeito neuroprotetor do vinho**

Pesquisa considera que o uso preventivo de polifenóis, bem como alimentos ricos em flavonoides melhora o desempenho cognitivo e restringe a neuroinflamação e o estresse oxidativo (NEHLIG, 2013). Podendo os flavonoides e as antocianinas da dieta proteger as células contra o dano oxidativo por três maneiras diferentes: aumento da glutathione intracelular, redução direta dos níveis de espécies reativas de oxigênio e prevenção do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (TALAVÉRA et al., 2005). Descoberta precedente indicam que estes compostos polifenólicos interagem com a biologia dos neurônios e são capazes de afetar direta ou indiretamente ações neuroprotetoras e neuromoduladoras (MEIRELES et al., 2016).

Evidência epidemiológica comprova que doenças neurodegenerativas estão negativamente correlacionadas com o consumo regular de produtos ricos em polifenóis (STANNER et al., 2004). Com isso, enfatiza-se a eficácia neuroprotetora do vinho tinto, tipicamente atribuída às atividades antioxidantes de seus compostos polifenólicos (PASINETTI 2012). Estudo emergente propõe que o resveratrol possa ter efeitos benéficos contra doenças neurodegenerativas, pois com a administração crônica deste composto a ratos adultos jovens é possível verificar que o córtex olfativo e o hipocampo são protegidos de danos provocados por injeção neurotóxica (VIRGILI e CONTESTABILE, 2000).

Alguns polifenóis atribuídos ao vinho tinto possuem atividade neuroprotetora devido à relação com proteínas do cérebro, pois são capazes de inibir a proteína  $\beta$ -amilóide na doença de Alzheimer (SMID, MAAG e MUSGRAVE, 2012). Assim como os flavonóides que atuam como agentes anti-inflamatórios e anticancerígenos, e desenvolvem papel protetor em distúrbios cardiovasculares e no declínio neuronal relacionado à idade (FERNANDES et al., 2017). Pesquisas sugerem que o consumo moderado de vinho tinto está inversamente correlacionado com a incidência de doenças neurodegenerativas como demência, Alzheimer e Parkinson (ONO et al., 2008), corroborando, cita-se que o extrato polifenólico de sementes de uva com ácido gálico e catequina inibe a deterioração cognitiva coincidente com os níveis da proteína  $\beta$ -amilóide (SARCHIELLI et al., 2018).

Estudos identificaram no vinho Cabernet Sauvignon ação neuroprotetora referenciada a presença de antocianinas, também destacaram no vinho Muscadine potencial ação dos compostos fenólicos na redução de déficits cognitivos (WANG et al., 2006; PASINETTI, 2012). Em outro estudo, pesquisadores avaliaram a ingestão de vinho tinto em humanos de meia idade no decorrer de 5 anos e concluíram que as substâncias não alcoólicas do vinho sejam responsáveis pela preservação da cognição e memória (NOOYENS et al., 2014). Assim como, as consequências positivas da suplementação de alimentos com fonte de flavonoides, que proporcionam melhorias na memória de trabalho e limitação de sintomas depressivos observados em adultos e crianças (WHYTE e WILLIAMS, 2015). Autores salientam que o consumo moderado de vinho reduz a incidência de doenças neurodegenerativas como o Alzheimer (MUKAMAL et al., 2003).

O consumo de flavonóides presentes em diversos alimentos como o vinho tinto, o cacau e o chá verde provocam mudanças estruturais e bioquímicas no hipocampo, área vinculada à cognição (SOKOLOV et al., 2013). Descreve-se também que o flavonóide epicatequina aumenta o BDNF no hipocampo, sustentando seus efeitos ansiolíticos verificados em testes comportamentais em camundongos (STRINGER et al., 2015). Estudos anteriores demonstram que camundongos tratados com chá verde, rica fonte de polifenóis antioxidantes, aumentam a ativação do CREB e os níveis de BDNF, incitando a neuroproteção no hipocampo (ASSUNÇÃO et al., 2010). Em pesquisa com a curcumina e seus compostos fenólicos, largamente usados para gerenciar distúrbios relacionados ao estresse e à depressão na China, observou-se decréscimo nos níveis de BDNF e CREB no hipocampo e córtex pré-frontal (XU et al., 2006). Resultados semelhantes determinam que alimentos ricos em fitoquímicos favorecem a reversão do déficits de memória, associado a presença de antocianinas e demais flavanóides no cérebro, indicando mudanças na memória de trabalho espacial em animais (WILLIAMS et al., 2008).

Os microRNAs possuem ação regulatória na expressão do CREB, a qual possui a função de facilitar a plasticidade sináptica (PREETHI et al., 2012). Em conjunto, relata-se a relação positiva entre o tratamento com resveratrol e a plasticidade sináptica, que pode, por sua vez, influenciar a aprendizagem e a memória (LIU et al., 2012). O resveratrol característico de uvas e encontrado no vinho exprime grande importância na progressão da cognição neuronal agindo como agente neuroprotetivo, melhorando aprendizagem e memória através da via microRNA-CREB-BDNF, no qual expressa seu potencial alvo terapêutico contra distúrbios do SNC e no envelhecimento (ZHAO et al., 2013). Também é descrito que o resveratrol melhora o declínio cognitivo nos camundongos com doença de Huntington (HO et

al., 2010), bem como melhora a aprendizagem e a memória em modelos com Alzheimer (SAHU, MADHYASTHA e RAO, 2013).

### 3 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, os elevados níveis de colesterol sanguíneo retratam um dos grandes problemas de saúde pública, estando diretamente relacionadas a hábitos de estilo de vida como a dieta, podendo desencadear expressivamente a incidência de doenças cardiovasculares, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, diabetes, entre outras enfermidades associadas a hipercolesterolemia (CARUANA; CAUCHI & VASSALLO, 2016).

A suplementação dietética com vinho tinto equivalente ao seu consumo moderado pode reduzir expressivamente indicadores de letalidade relacionados às doenças cardiovasculares e atenuar o desenvolvimento de neuropatologias (LI et al., 2017). Este efeito neuroprotetor está atribuído às atividades antioxidantes dos polifenóis extraídos da uva no processo de vinificação (PASINETTI, 2012).

Os compostos bioativos expressos no vinho tinto demonstram ação citoprotetora induzindo alterações no perfil lipoproteico, na agregação plaquetária e nos mecanismos redox, minimizando distúrbios cardiovasculares (COSTANZO et al., 2011).

A partir disto, é necessário verificar o efeito do vinho tinto (Ruby Carbenet) sobre o perfil lipídico, os níveis de marcadores inflamatórios e na manutenção da neuroplasticidade em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> hipercolesterolêmicos.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Investigar o potencial efeito neuroprotetor do vinho Ruby Carbenet sobre parâmetros neuroquímicos e memória em camundongos nocaute para o receptor LDLr<sup>-/-</sup> expostos à dieta hipercolesterolêmica.

### 4.2 Objetivos específicos

- Determinar *in vitro* o conteúdo de polifenóis totais, antocianinas, ácido cafeico, ácido gálico, epicatequina e resveratrol no vinho tinto Ruby Cabernet.
- Analisar o efeito do tratamento com vinho tinto sobre o perfil lipídico em camundongos nocaute para o receptor LDLr<sup>-/-</sup> e expostos à dieta hipercolesterolêmica.
- Investigar o efeito do tratamento com vinho tinto sobre a memória espacial em camundongos nocaute para o receptor LDLr<sup>-/-</sup> submetidos à dieta hipercolesterolêmica.
- Determinar a atividade da AChE no hipocampo e córtex pré-frontal em camundongos nocaute para o receptor LDLr<sup>-/-</sup> e expostos a dieta rica em colesterol juntamente com o tratamento com vinho tinto.
- Avaliar os níveis dos mediadores inflamatórios (citocinas) sob a influência da dieta hipercolesterolêmica e do tratamento com vinho tinto nos camundongos nocaute para o receptor LDLr<sup>-/-</sup>.
- Analisar o efeito do tratamento com vinho tinto e o efeito da dieta hipercolesterolêmica em camundongos nocaute para o receptor LDLr<sup>-/-</sup> sobre o mecanismo neurológico microRNAs-CREB-BDNF, analisados no hipocampo e córtex pré-frontal.

## 5 MANUSCRITO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. Os itens *Materiais e Métodos*, *Resultados*, *Discussão e Referências Bibliográficas*, encontram-se no próprio artigo. O **artigo** está disposto na forma que será submetido na revista “*European Journal of Pharmacology*”.

### **Artigo:**

“Neuroprotetic effect of Ruby Cabernet wine on memory loss in Hypercholesterolemic mice”.

**Neuroprotetic effect of Ruby Cabernet wine on memory loss in Hypercolesterolemic mice**

- Cristini Escobar Viana<sup>1</sup> cristiniv@hotmail.com.br
- Etiara de Mattos Moraes<sup>1</sup> mattosetiara@yahoo.com.br
- Franciele Romero Machado<sup>1</sup> fran\_romero\_machado@hotmail.com
- Silvana Peterini Boeira<sup>1</sup> silvespeter@yahoo.com.br
- Cristiano Ricardo Jesse<sup>1\*</sup> cristianoricardojesse@yahoo.com.br

<sup>1</sup>Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas aplicadas às Moléculas Bioativas – Unipampa, Universidade Federal do Pampa - Campus Itaqui, Itaqui, RS, 97650-000, Brazil.

\*Corresponding author:

Cristiano Ricardo Jesse

Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui

Rua Luiz Joaquim de Sá Britto, s/n - Bairro: Promorar, Itaqui, Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 97650-000

Email: cristianoricardojesse@yahoo.com.br



**Abstract**

In this study we evaluated the potential neuroprotective effect of Ruby Carbenet wine in C57BJ/6 *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice exposed to the hypercholesterolemic diet. In the wine was quantified polyphenols, anthocyanins, caffeic acid, gallic acid, epicatechin and resveratrol. The animals were divided into 4 groups and for the induction of hypercholesterolemia cholesterol was diluted in pure alcohol 96°C, on the commercial diet (Puro Trato PB 22) for 90 days. After treatment it was performed behavioral test, Morris water maze task (MWM), after, the blood, the prefrontal cortex and the hippocampus were collected. Lipidic plasma levels were determined and levels of cytokines: interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin-6 (IL-6) were determined in the brain structures. The hypercholesterolemic diet elevated plasma lipids, cytokines and AChE activity, as well as decreased BDNF, CREB and the biomarkers miRNA146a and 155. However, the wine showed a protective effect, since it presented antioxidant potential confirmed by its content of gallic acid 135.3 mg/L, epicatechin 242.2 mg/L and resveratrol 102.2 mg/L. The moderate consumption of red wine reversed the levels of BDNF, CREB and miRNAs, providing improvements in cognitive deficit and plasticity, corroborating with the result of the behavioral test (MWM), which is based on the learning and memory system. Our dataset showed that Ruby Carbenet wine has a neuroprotective effect, acting in the maintenance of neuroplasticity in hypercholesterolemic *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice.

**Keywords:** Phenolic compounds. Cognitive deficit. High cholesterol diet. Knockout mice for *Ldlr*<sup>-/-</sup> receptor. Neuroplasticity.

## Introduction

Hypercholesterolemia is characterized by the presence of high cholesterol levels in the blood, triggering cellular and molecular damage, playing a central role in the initiation and progression of atherosclerosis plaques (MAILER et al., 2017). Evidences suggests that high blood cholesterol stimulates systemic inflammatory processes, has destructive impact on brain function, expresses negative influences on progressive functional and cognitive function, characterizing neurodegenerative diseases such as Alzheimer's (EL-KADER & AL-JIFFRI, 2016). The neuroinflammation process caused by oxidative stress and the presence of a series of proinflammatory cytokines reduces cell replication rate, contributing to pathological mechanisms involving the Central Nervous System (HOPPERTON et al., 2017). It has been recognized that there is comorbidity between peripheral inflammation and synaptic plasticity, causing memory and depression deficits dependent on the hippocampus and cortex (Wu et al., 2017).

The hypercholesterolemic diet leads to memory deficits dependent on brain structures, as well as the deregulation as Binding Protein of the Brain (CREB) and microRNAs (miRNA) (LI et al. , 2015). In agreement, CREB is associated with the loss of synaptic plasticity at stages of inflammation (GUO et al., 2017). The mechanisms involved in the expression of miR-146a and miR-155 demonstrated a negative correlation with systemic glycemia, insulin resistance and inflammatory cytokines (JUNIOR et al., 2017).

It has been reported that red wine contains polyphenolic compounds that act as direct eliminators of free radicals (TOMAZETTI et al., 2015), among these, epicatechin, a flavonoid that has a catechol group in its structure and is efficient in the elimination of free radicals (DE ROSSO et al., 2015). In addition to the classical antioxidant mechanism of phenolic compounds, it is highlighted its neuroprotective effect, capable of involve its capacity in the modulation of the cognitive system (MUÑOZ-GONZALEZ et al., 2014).

The ingestion of wine is related to physical and mental benefits contributing to the maintenance of brain health, involving changes in synaptic plasticity and influencing learning and memory mechanisms (CARUANA; CAUCHI & VASSALLO, 2016). Its moderate consumption refers to neuroprotective benefits, since the grape contains resveratrol, a natural polyphenol with antioxidant action, which modulates synergistically varied molecular targets, proposing therapeutic efficacy in the pathogenesis of memory (CARUANA, CAUCHI & VASSALLO, 2016).

It was recognized that the red wine components increase the expression of BDNF, which is fundamental to maintain neuronal survival and growth, and appears as a mediator of

synaptic efficiency (WANG et al., 2016). Additional experiments suggest that the effects of resveratrol on a microRNA-CREB-BDNF mechanism promote positive actions in cognitive processes (ZHAO et al., 2013).

Considering the decline in cognitive function and memory deficit associated with the hypercholesterolemia diet and the benefits that red wine compounds bring to neurodegenerative problems, it is important developing preventive strategies, focusing on antioxidant-rich natural products, in order to mitigate the symptoms. Thus, this study aimed to investigate the possible neuroprotective effect of Ruby Carbenet wine on the lipid profile, inflammatory markers levels, maintenance of neuroplasticity, and in learning and memory processes in hypercholesterolemic *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Red Wine Sample**

Ruby Cabernet 2009 red wine was purchased at the local commerce of the city of Itaqui R.S., coming from the Campus de Cima Winery located in the West Frontier of Rio Grande do Sul - Brazil, characterized as the Region of the Campaign. The wine was subjected to in vitro determination of its constituents.

#### **2.1.1 Determination of phenolics in red wine Ruby Cabernet**

The concentration of total polyphenols was determined by the colorimetric method of Folin-Ciocalteu described by Singleton and Rossi (1965). This method is based on the reduction reaction of the mixture of phosphotungstic acid and phosphomolybdic in alkaline medium, oxides of tungsten and molybdenum, caused by phenolic compounds to form a blue colored complex, whose absorption maximum is at 760 nm. The concentration of phenolic compounds was expressed as gallic acid equivalents (GAE). UV-Vis absorbance was measured in a Perkin Elmer® Lambda 35 UV/Vis Double array Spectrophotometer (Norwalk, CT, USA) with 1-cm quartz cells.

#### **2.1.2 Determination of anthocyanins in red wine Ruby Cabernet**

The were evaluated by the method Lees & Francis (1972) with modifications, conducting readings in a spectrophotometer Biospectro® UV-Vis, model SP-220, at 520 nm results were expressed in mg/L of wine.

### **2.1.3 Determination of caffeic acid, gallic acid, epicatechin and resveratrol in red wine Ruby Cabernet**

Caffeic acid, gallic acid, epicatechin and resveratrol were also quantified by HPLC in a Prominence Liquid Chromatograph Shimadzu® (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a LC-20AT pump, a SIL-20A auto sampler, a SPD-20AT PDA detector and a CTO-20A column oven. LC Solution V. 1.24 SP1 system software was used to control the equipment and to obtain data and responses from the LC system. A reversed phase ODS-Hypersil Thermo Scientific C18 column (250 x 4.6 mm i.d., 5- $\mu$ m particle size) (Bellefonte, United States) was used for chromatographic separation. The analyses were performed using a condition previous published (Quirós, Lopez-Hernández, Ferraces-Casais & Lags-Yusty, 2007) in a gradient elution mode with a 0.8 mL/min flow, employing two mobile phases: A (water/acetonitrile/acetic acid, 67:32:1, v/v/v) and B (water/acetic acid, 99:1, v/v). The gradient profile was 0-4 min, 20-30% A and 80-70% B; 4-8 min, 30-40% A and 70-60% B; 8-12 min, 40-65% A and 60-35% B; 12-16 min, 65-80% A and 35-20% B; 16-20 min, 80-95% A and 20-5% B; 20-22 min, 95-97% A and 5-3% B; 22-24 min, 97-100% A and 3-0% B; and 24-35 min, 100% A, followed by re-equilibration of the column for 5 min. Detection was performed at 280 nm. The injection volume was 20  $\mu$ L and all analyses were conducted at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . For standard preparation, the chemicals gallic acid, caffeic acid, epicatechin and resveratrol were dissolved in ethanol and mixed to obtain a solution containing each substance at a final concentration of 250.0  $\mu\text{g/mL}$ . For wine analysis, the samples were injected directly, as marketed. All solutions were filtered through a 0.45- $\mu\text{m}$  membrane filter from Millipore (Milford, MA, USA) before injection.

## **2.2 Animals**

Were used twenty wild-type C57BJ6 mice (90 days old) and twenty C57BJ6 mice (90 days old) with gene deletion for low density lipoprotein (LDLr<sup>-/-</sup>) receptors, adults, weighing 20 to 25 g. The animals were packed in polyethylene cages with 10 animals in each box and kept at room temperature between 22-24°C, following the cycle clear-dark (12-12 hours), with free access to food and water. The present experimental study was approved by the Institutional Ethics Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources from the Federal University of Pampa, Brazil and registered under the number of (034/2017). All efforts were made to minimize animals suffering and to reduce the number of animals used in the experiments.

### 2.3 Experimental Protocol

For the induction of hypercholesterolemia in the animals, cholesterol diluted in pure alcohol 96°C was sprinkled on the commercial diet (Puro Trato PB 22), containing crude protein 220 g/Kg, ethereal extract 40 g/Kg, crude fiber 70 g/Kg, calcium (minimum) 12 g/Kg, calcium (maximum) 13 g/Kg, phosphorus 8,000 mg/Kg, mineral matter 80 g/Kg. For the dose of 400 µL of red wine administered per day to the mice the ratio between moderate daily consumption of wine for a human of 70 kg and staggered for a mouse of approximately 25 g was maintained, following the standards of Reagan-Shaw, Nihal & Ahmad (2008). The animals were divided into 4 groups (n = 10): Group 1: Control (commercial diet/alcohol 12%); Group 2: Wine (commercial diet/400 µL wine per gavage); Group 3: hypercholesterolemia (commercial diet plus cholesterol/alcohol 12%); Group 4: hypercholesterolemia/wine (commercial diet plus cholesterol/400 µL wine per gavage). The treatments mentioned above lasted for 90 consecutive days. After the end of the treatment, the experimental test consisted of a training session and 24 hours after the test session in Morris water maze task (Figure 1).

### 2.4 Behavioral Analysis: Morris water maze task (MWM)

The Morris water maze task (MWM) was performed in a circular swimming pool similar to that described by Morris et al. (1982). The apparatus was made of fiberglass painted black, 97 cm in diameter and 60 cm in height. For the tests, the tank was filled with water maintained at  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . The target platform (10 x 10 cm) was made of transparent Plexiglas and will be submerged 1-1.5 cm beneath the surface of the water. The starting points for the animals were marked on the outside of the pool as north (N), south (S), east (E) and west (W). Four distant visual signals (55 x 55 cm) were placed on the walls of the water maze room. All the signals were positioned with the bottom edge 30 cm above the upper limit of the water tank and in the standard setting, the position of each symbol marked the midpoint of the perimeter of a quadrant (circle = NE quadrant, square = SE quadrant, cross = SW quadrant, and diamond = NW quadrant). The apparatus was located in a room with indirect incandescent illumination. The mice were submitted to a spatial reference memory version of the water maze using a protocol described by PREDIGER et al. (2007). The training session consisted of ten consecutive tests where the animals were left in the tank facing the wall and then allowed to swim freely to the submerged platform. The platform was located in a constant position (middle of the southwest quadrant), equidistant from the center and the wall of the pool. If the animal do not find the platform during a period of 60 s, it was gently guided

to the platform. The animal was allowed to remain on the platform for 10 s after escaping and was removed from the tank for 20 s before being placed at the next starting point in the tank. This procedure was repeated ten times, with the starting points (the axis of one imaginary quadrant) varying in a pseudo-randomized manner. The test session was carried out 24 h later and consisted of a single probe trial wherein the platform was removed from the pool and each mice was allowed to swim for 60 s in the maze. Behavioral data were recorded and analyzed using ANY-maze video screening software (Stoelting Co., IL, USA). The latency to direct the platform location and the time spent in the correct quadrant (i.e., where the platform was located in the training session) were computed for subsequent analysis.

## **2.5 Tissue Preparations**

The animals were anesthetized with pentobarbital (180 mg/Kg, intraperitoneal) and the blood was collected by cardiac puncture where it will be transferred to tubes containing heparin (anticoagulants), right after it was centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes. The prefrontal cortex and the hippocampus were removed for neurochemical assays.

## **2.6 Lipid Parameters**

The enzymatic determination of cholesterol (total and fractions) and triglycerides was carried out through commercial Labtest Lab kits manufactured in Minas Gerais. And with these determinations the non-HDL cholesterol was calculated using the equation:  $(LDL + VLDL + IDL) = TC - HDL$ . The atherogenic index was calculated using the reason =  $TG/HDL$ .

## **2.7 Cytokine levels**

The levels of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin-6 (IL-6) levels in the hippocampus and prefrontal cortex were determined using trials DuoSet Kits ELISAs, R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. The results will be presented as tissue pg/mg.

## **2.8 Determination of acetylcholinesterase activity (AChE)**

AChE was determined by the method of ELLMAN et al. (1961), modified by ROCHA et al. (1993) in the hippocampus and prefrontal cortex.

## **2.9 Determination of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) level**

BDNF levels in the hippocampus and prefrontal cortex was measured using a BDNF Emax ImmunoAssay System kit (Promega, Madison, WI, USA).

## **2.10 Nuclear/cytoplasmic localization of CREB**

The hippocampus and prefrontal cortex were harvested using NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (Thermo Scientific) reagents according to manufacturer's protocols. Briefly, the hippocampus and prefrontal cortex were lysed in a cytoplasmic extraction buffer and centrifuged. Nuclear extraction buffer was added to the pellet, which was vortexed and centrifuged (14,000g) at 4 C to extract the remaining nuclear fraction. Protein concentrations of the samples were then determined using the DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) before Western blotting.

## **2.11 Western blotting**

Twelve percent sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels were used to separate 15 e 35 µg of total protein under reducing conditions before transferring to polyvinylidene fluoride membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Membranes were then blocked with a 1:1 solution of phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 and Odyssey Blocking Buffer (Cedarlane, Burlington, Ontario, Canada) for 1 hour. After blocking, the blots were probed overnight at 4 C with the following primary antibodies: human CREB (Cell Signaling Technology, Danvers MA, USA; diluted 1:200), phosphorylated CREB (pCREB)-Ser133 (Cell Signaling Technology; diluted 1:200), pCREB-Ser129 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA; diluted 1:200), b-catenin (Cell Signaling Biotechnology; diluted 1:500), or alpha-tubulin (Sigma-Aldrich; diluted 1:8000). After washing with PBS containing 0.5% Tween-20 (PBS-T), blots were incubated with the secondary antibodies IRDye 680-conjugated goat anti-rabbit and IRDye 800CW-conjugated goat anti-mouse (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA; diluted 1:8000) for 1 hour at room temperature, washed with PBS-T, and scanned using an Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences). Band intensities were quantified by densitometry with local background subtraction using LI-COR Odyssey Software, version 2.0.

## **2.12 Taqman® miRNA real time qPCR (miRNA 146a and miRNA 155)**

Total small RNA in the hippocampus and prefrontal cortex was extracted using PureLinK miRNA Isolation Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

RNA was reverse-transcribed using specific miRNA stem-loop primers and the Taqman microRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). Mature miRNA expression was measured with Taqman microRNA assays (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions.

### 2.13 Protein quantification

Protein concentration in the PFC and HP was measured by the method of Bradford (BRADFORD, 1976), using bovine serum albumin as the standard.

### 2.14 Statistical analysis

It was done first by Shapiro-Wilk to verify the normality of the data. After the data were used for the statistical analysis, which were done through the program GraphPad Prism 6.0, using the two-way analysis, with the variance of ANOVA, followed by Bonferroni post-hoc, and significance value of  $p < 0,05$ .

## 3 Results

### 3.1 Determination of phenolics, anthocyanins, caffeic acid, gallic acid, epicatechin and resveratrol in red wine Ruby Cabernet

In our analyzes, red wine Ruby Cabernet Harvest 2009 showed significant concentrations of total anthocyanins of 68.2 mg/L, total polyphenols were 4.59 mg/LGAE, gallic acid 135,3 mg/L, caffeic acid 91.2 mg/L, resveratrol 102.2 mg/L and epicatechin 242.2 mg/L.

### 3.2 Lipid Parameters

#### 3.2.1 Triglyceride levels

Two-way ANOVA of the triglyceride levels demonstrated a significant effect of wine ( $F_{1,24} = 10.22$ ,  $p < 0.01$ ),  $Ldlr^{-/-}$  ( $F_{1,24} = 82.14$ ,  $p < 0.001$ ) and Wine X  $Ldlr^{-/-}$  interaction ( $F_{1,24} = 25.29$ ,  $p < 0.001$ ). Post hoc comparisons showed that the  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group demonstrated a significantly increase of plasmatic triglyceride levels compared to control group (wild/vehicle) ( $p < 0.001$ ). The treatment with wine significantly decreased triglyceride levels compared to  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group, no returning to level of wild/vehicle group (control group). (Fig. 2A).



Pearson's correlation tests showed a significantly positive correlation (TG levels X AChE activity of HP and PFC, TG X TNF levels of HP and PFC, TG X IL-1 $\beta$  levels of HP and PFC, TG X IL-6 level of HP and PFC, TG X IFN- $\gamma$  levels of HP and PFC (Table 1) and a significant negative correlation (TG X BDNF levels of HP and PFC, TG X CREB levels of HP and PFC, TG X miR 146 levels of HP and PFC, TG X miR 155 levels of HP and PFC) (Table 1).

### 3.2.2 Cholesterol levels

Statistical analysis of the cholesterol levels showed a significant effect of wine ( $F_{1,24}=27.45$ ,  $p < 0.001$ ), Ldlr<sup>-/-</sup> ( $F_{1,24}=52.68$ ,  $p < 0.001$ ) and wine X Ldlr<sup>-/-</sup> interaction ( $F_{1,24}=25.35$ ,  $p < 0.001$ ). Post hoc comparisons demonstrated that the Ldlr<sup>-/-</sup>/vehicle group has significantly high levels of plasmatic cholesterol compared to control group ( $p < 0.001$ ). Wine treatment significantly decreased the cholesterol levels of Ldlr<sup>-/-</sup> mice when compared to Ldlr<sup>-/-</sup>/vehicle group, but not return to control levels. The wine treatment significantly attenuated the increase of cholesterol levels compared to wild/wine group (Fig. 2B).

Pearson's correlation tests demonstrated a significantly positive correlation (TC levels X AChE activity of HP and PFC, TC X TNF levels of HP and PFC, TC X IL-1 $\beta$  levels of HP and PFC, TC X IL-6 levels of HP and PFC, TC X IFN- $\gamma$  levels of HP and PFC) (Table 1) and a significant negative correlation (TC X BDNF levels of HP and PFC, TC X CREB levels of HP and PFC, TC X miR 146 levels of HP and PFC, TC X miR 155 levels of HP and PFC) (Table 1).

### 3.2.3 HDL levels

Two-way ANOVA of the HDL levels revealed a significant effect of wine ( $F_{1,24}=17.21$ ,  $p < 0.001$ ), Ldlr<sup>-/-</sup> ( $F_{1,24}=15.87$ ,  $p < 0.001$ ) and wine X Ldlr<sup>-/-</sup> interaction ( $F_{1,24}=15.87$ ,  $p < 0.001$ ). Post hoc comparisons revealed that the Ldlr<sup>-/-</sup>/vehicle group has a significantly decrease of the HDL levels compared to control group ( $p < 0.01$ ). The wine treatment significantly increased the HDL levels compared to control group. Interestingly, the treatment with wine significantly elevated the HDL levels (*per se* effect) when compared to control group (Fig. 2C)

Pearson's correlation tests revealed a significantly positive correlation (HDL levels X BDNF of HP and PFC, HDL X CREB levels of HP and PFC, HDL X miR 146 levels of HP and PFC, HDL X miR 155 levels of HP and PFC, HDL X IFN- $\gamma$  levels of HP and PFC (Table 1) and a significant negative correlation (HDL X AChE activity of HP and PFC, HDL X

TNF- $\alpha$  levels of HP and PFC, HDL X IL-1 $\beta$  levels of HP and PFC, HDL X IFN- $\gamma$  levels of HP and PFC) (Table 1).

### 3.2.4 LDL levels

Statistical analysis of the LDL levels revealed a significant effect of wine ( $F_{1,24}= 16.54, p < 0.001$ ),  $Ldlr^{-/-}$  ( $F_{1,24}= 72.54, p < 0.001$ ) and wine X  $Ldlr^{-/-}$  interaction ( $F_{1,24}= 14.55, p < 0.001$ ). Post hoc comparisons demonstrated that the  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group has a significantly increase of LDL levels compared to control group ( $p < 0.001$ ). The wine treatment significantly decreased LDL levels compared to  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group, but did not return to control group ( $p < 0.05$ ) levels (Fig. 2D).

Pearson's correlation tests showed a significantly positive correlation (LDL levels X AChE activity of HP and PFC, LDL X TNF levels of HP and PFC, LDL X IL-1 $\beta$  levels of HP and PFC, LDL X IFN- $\gamma$  levels of HP and PFC) (Table 1) and a significant negative correlation (LDL X BDNF levels of HP and PFC, LDL X CREB levels of HP and PFC, LDL X miR 146 a levels of HP and PFC, LDL X miR 155 levels of HP and PFC) (Table 1).

### 3.2.5 OxLDL levels

Two-way ANOVA of the oxidized LDL (OxLDL) revealed a significant effect of wine ( $F_{1,24}= 31.20, p < 0.001$ ),  $Ldlr^{-/-}$  ( $F_{1,24}= 50.22, p < 0.001$ ) and wine X  $Ldlr^{-/-}$  interaction ( $F_{1,24}= 0.15, p < 0.72$ ). Post hoc comparisons showed that the  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group has a significantly increase of the LDL oxidized levels compared to control group ( $p < 0.01$ ). The wine treatment significantly attenuated decrease the OxLDL levels compared to  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group ( $p < 0.05$ ) levels (Fig. 2E).

Pearson's correlation tests demonstrated a significantly positive correlation (oxLDL levels X AChE activity of HP and PFC, oxLDL x TNF levels of HP and PFC, oxLDL X IL-6 levels of HP and PFC, oxLDL X IFN- $\gamma$  levels of HP and PFC) (Table 1) and a significant negative correlation (oxLDL X BDNF levels of HP and PFC, oxLDL X CREB levels of HP and PFC, oxLDL X miR 146 a levels of HP and PFC, oxLDL X miR 155 levels of HP and PFC) (Table 1).

### 3.2.6 Atherogenic index (AI)

Statistical analysis of the atherogenic index (AI) revealed a significant effect of wine ( $F_{1,24}= 30.19, p < 0.001$ ),  $Ldlr^{-/-}$  ( $F_{1,24}= 62.01, p < 0.001$ ) and wine X  $Ldlr^{-/-}$  interaction ( $F_{1,24}= 6.02, p < 0.02$ ). Post hoc comparisons demonstrated that the  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group has a

significantly increase of the AI compared to control group ( $p < 0.001$ ). The chronic treatment with wine significantly decreased the AI compared to  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group. The wine treatment attenuated the increase of previous index levels compared to wild/wine group (Fig. 2F).

Pearson's correlation tests revealed a significantly positive correlation (AI levels X AChE activity of HP and PFC, AI X TNF levels of HP and PFC, AI X IL- $\beta$  levels of HP and PFC, AI X IL-6 levels of HP and PFC, AI X INF- $\gamma$  levels of HP and PFC) (Table 1) and a significant negative correlation (AI X BDNF levels of HP and PFC, AI X CREB levels of HP and PFC, AI X miR 146 a levels of HP and PFC, AI X miR 155 levels of HP and PFC) (Table 1).

### 3.3 Behavioral Analysis: Morris water maze task (MWM)

#### 3.3.1 Time in correct quadrant

Two-way ANOVA of the time in correct quadrant revealed a significant effect of wine ( $F_{1,24} = 7.06$ ,  $P < 0.02$ ),  $Ldlr^{-/-}$  ( $F_{1,24} = 8.37$ ,  $P < 0.01$ ) and wine x  $Ldlr^{-/-}$  interaction ( $F_{1,24} = 4.93$ ,  $P < 0.05$ ). Post hoc comparisons demonstrated that animals in the  $Ldlr^{-/-}$ /wine group showed a significant increase in the time spent in the correct quadrant compared to  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group. Oral daily administration of wine protected against impairments in water maze test performance when compared to  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group (Fig. 3A).

Pearson's correlation tests showed a significantly positive correlation (time in correct quadrant X BDNF, CREB, miR 146 a, miR 155 of HP and PFC) (Table 1) and a significant negative correlation (time in correct quadrant X AChE activity, TNF levels, IL-1 $\beta$  levels, IL-6 levels, INF- $\gamma$  levels in the HP and PFC) (Table 1).

#### 3.3.2 The latency to target platform location

Statistical analysis of the latency to target platform location showed a significant of wine ( $F_{1,24} = 5.23$ ,  $P < 0.04$ ),  $Ldlr^{-/-}$  ( $F_{1,24} = 30.63$ ,  $P < 0.001$ ) and wine x  $Ldlr^{-/-}$  interaction ( $F_{1,24} = 8.28$ ,  $P < 0.01$ ). Post hoc comparisons revealed that animals in the  $Ldlr^{-/-}$ /wine group showed a significant decrease in the latency to target platform location compared to  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group. The administration of wine significantly attenuated the latency to target platform location compared to control group ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3B).

Pearson's correlation tests demonstrated a significantly positive correlation (latency to target platform location X AChE activity, TNF levels, IL-1 $\beta$  levels, IL-6 levels, INF- $\gamma$  levels

in the HP and PFC) (Table 1) and a significant negative correlation (latency to target platform location X BDNF levels, CREB, miR 146 a, miR 155 of HP and PFC) (Table 1).

### 3.4 Determination of acetylcholinesterase activity (AChE)

#### 3.4.1 AChE activity in the hippocampus

Two-way ANOVA of the AChE activity in the hippocampus demonstrated a significant effect of wine ( $F_{1,24} = 13.71, p < 0.001$ ),  $Ldlr^{-/-}$  ( $F_{1,24} = 47.66, p < 0.001$ ) and Wine X  $Ldlr^{-/-}$  interaction ( $F_{1,24} = 4.88, p < 0.05$ ). Post hoc comparisons demonstrated that the  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group has a significantly increase of AChE levels compared to control group ( $p < 0.01$ ). Wine treatment significantly decreased the AChE levels compared to  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group. The wine treatment attenuated the increase of AChE levels compared to wild/wine group (Fig. 4A).

#### 3.4.2 AChE activity in the pré-frontal cortex

Statistical analysis of the AChE levels in the prefrontal cortex showed a significant effect of wine ( $F_{1,24} = 8.64, p < 0.01$ ),  $Ldlr^{-/-}$  ( $F_{1,24} = 12.50, p < 0.004$ ) and wine X  $Ldlr^{-/-}$  interaction ( $F_{1,24} = 4.87, p < 0.05$ ). Post hoc comparisons showed that the  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group demonstrated a significantly increase of AChE levels compared to control group (wild/control) ( $p < 0.01$ ). The treatment with wine significantly decreased AChE levels compared to  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group, returning to control (Wild/Wine) levels (Fig. 4B).

### 3.5 Cytokine levels

#### 3.5.1 TNF- $\alpha$ levels in the hippocampus

Two-way ANOVA of the TNF- $\alpha$  levels in the hippocampus demonstrated a significant effect of wine ( $F_{1,24} = 7.39, p < 0.01$ ),  $Ldlr^{-/-}$  ( $F_{1,24} = 28.17, p < 0.001$ ) and Wine X  $Ldlr^{-/-}$  interaction ( $F_{1,24} = 7.76, p < 0.01$ ). Post hoc comparisons showed that the  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group demonstrated a significantly increase of TNF- $\alpha$  levels compared to control group ( $p < 0.001$ ). The treatment with wine significantly decreased TNF- $\alpha$  levels compared to  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group, but did not return to control Wild/Wine level (Fig. 5A).

#### 3.5.2 TNF- $\alpha$ levels in the prefrontal cortex

Statistical analysis of the TNF- $\alpha$  levels in the prefrontal cortex showed a significant effect of wine ( $F_{1,24} = 5.49, p < 0.03$ ), Ldlr<sup>-/-</sup> ( $F_{1,24} = 47.88, p < 0.001$ ) and wine X Ldlr<sup>-/-</sup> interaction ( $F_{1,24} = 8.87, p < 0.01$ ). Post hoc comparisons demonstrated that the Ldlr<sup>-/-</sup>/vehicle group has a significantly increase of TNF- $\alpha$  levels compared to control group ( $p < 0.001$ ). The chronic treatment with wine significantly decreased TNF- $\alpha$  levels compared to Ldlr<sup>-/-</sup>/vehicle group, however did not return to control group ( $p < 0.05$ ) levels. (Fig. 5B).

Oral daily administration of wine protected the increase of TNF- $\alpha$  levels when compared to Ldlr<sup>-/-</sup>/vehicle group in the hippocampus and prefrontal cortex (Fig. 4A e 4B).

### 3.5.3 IL-1 $\beta$ levels in the hippocampus

Two-way ANOVA of the IL-1 $\beta$  levels in the hippocampus demonstrated a significant effect of wine ( $F_{1,24} = 14.46, p < 0.002$ ), Ldlr<sup>-/-</sup> ( $F_{1,24} = 93.34, p < 0.001$ ) and Wine X Ldlr<sup>-/-</sup> interaction ( $F_{1,24} = 21.26, p < 0.001$ ). Post hoc comparisons showed that the Ldlr<sup>-/-</sup>/vehicle group demonstrated a significantly increase of IL-1 $\beta$  levels compared to control group ( $p < 0.001$ ). The treatment with wine significantly decreased IL-1 $\beta$  levels compared to Ldlr<sup>-/-</sup>/vehicle group, but did not return to control level (Fig. 5C).

### 3.5.4 IL-1 $\beta$ levels in the prefrontal cortex

Statistical analysis of the IL-1 $\beta$  levels in the prefrontal cortex showed a significant effect of wine ( $F_{1,24} = 6.94, p < 0.02$ ), Ldlr<sup>-/-</sup> ( $F_{1,24} = 49.80, p < 0.001$ ) and wine X Ldlr<sup>-/-</sup> interaction ( $F_{1,24} = 11.49, p < 0.005$ ). Post hoc comparisons demonstrated that the Ldlr<sup>-/-</sup>/vehicle group has a significantly increase of IL-1 $\beta$  levels compared to control group ( $p < 0.001$ ). Wine treatment significantly decreased IL-1 $\beta$  levels compared to Ldlr<sup>-/-</sup>/vehicle group, but did not return to control Wild/Wine group levels (Fig. 5D).

### 3.5.5 IL-6 levels in the hippocampus

Two-way ANOVA of the IL-6 levels in the hippocampus demonstrated a significant effect of Ldlr<sup>-/-</sup> ( $F_{1,24} = 126.88, p < 0.001$ ) and Wine X Ldlr<sup>-/-</sup> interaction ( $F_{1,24} = 9.70, p < 0.008$ ). Post hoc comparisons showed that the Ldlr<sup>-/-</sup>/vehicle group demonstrated a significantly increase of IL-6 levels compared to control group ( $p < 0.001$ ). The treatment with wine significantly decreased IL-6 levels compared to Ldlr<sup>-/-</sup>/vehicle group, but did not return to control group ( $p < 0.05$ ) (Fig. 5E).

### 3.5.6 IL-6 levels in the prefrontal cortex

Statistical analysis of the IL-6 levels in the prefrontal cortex showed a significant effect of  $Ldlr^{-/-}$  ( $F_{1,24} = 59.40$ ,  $p < 0.001$ ) and wine X  $Ldlr^{-/-}$  interaction ( $F_{1,24} = 5.11$ ,  $p < 0.04$ ). Post hoc comparisons demonstrated that the  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group has a significantly increase of IL-6 levels compared to control group ( $p < 0.001$ ). Wine treatment significantly decreased IL-6 levels compared to  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group, but did not return to control group levels (Fig. 5F). Oral daily administration of wine protected the increase of IL-6 levels in the hippocampus and pré-frontal córtex compared  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group.

### 3.5.7 IFN- $\gamma$ levels in the hippocampus

Two-way ANOVA of the IFN- $\gamma$  levels in the hippocampus demonstrated a significant effect of  $Ldlr^{-/-}$  ( $F_{1,24} = 58.92$ ,  $p < 0.001$ ) and Wine X  $Ldlr^{-/-}$  interaction ( $F_{1,24} = 8.59$ ,  $p < 0.01$ ). Post hoc comparisons showed that the  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group demonstrated a significantly increase of IFN- $\gamma$  levels compared to control group ( $p < 0.001$ ). The treatment with wine significantly decreased IFN- $\gamma$  levels compared to  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group, but not at control group ( $p < 0.05$ ) levels (Fig. 5G).

### 3.5.8 IFN- $\gamma$ levels in the prefrontal cortex

Statistical analysis of the IFN- $\gamma$  levels in the prefrontal cortex showed a significant effect of wine ( $F_{1,24} = 5.34$ ,  $p < 0.03$ ),  $Ldlr^{-/-}$  ( $F_{1,24} = 38.13$ ,  $p < 0.001$ ) and wine X  $Ldlr^{-/-}$  interaction ( $F_{1,24} = 8.07$ ,  $p < 0.01$ ). Post hoc comparisons demonstrated that the  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group has a significantly increase of IFN- $\gamma$  levels compared to control group ( $p < 0.001$ ). The chronic treatment with wine significantly decreased IFN- $\gamma$  levels compared to  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group, but did not return to control group levels (Fig. 5H).

Oral daily administration of wine protected the increase of IFN- $\gamma$  levels in the hippocampus and prefrontal cortex.

## 3.6 Determination of the level of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and CREB

### 3.6.1 BDNF levels in the hippocampus

Two-way ANOVA of the BDNF levels in the hippocampus demonstrated a significant effect of wine ( $F_{1,24} = 5.68$ ,  $p < 0.03$ ),  $Ldlr^{-/-}$  ( $F_{1,24} = 6.77$ ,  $p < 0.02$ ). Post hoc comparisons revealed that the  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group has a significantly decrease of the BDNF levels

compared to control group ( $p < 0.01$ ). The wine treatment significantly increased the BDNF levels compared to  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group, returning to control levels (Fig. 6A).

### 3.6.2 BDNF levels in the prefrontal cortex

Statistical analysis of the BDNF levels in the prefrontal cortex showed a significant effect of wine ( $F_{1,24} = 9.61$ ,  $p < 0.009$ ),  $Ldlr^{-/-}$  ( $F_{1,24} = 13.12$ ,  $p < 0.003$ ). Post hoc comparisons demonstrated that the  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group has a significantly decrease of the BDNF levels compared to control group ( $p < 0.001$ ). Wine treatment significantly increased BDNF levels compared to  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group (Fig. 6B).

### 3.6.3 CREB levels in the hippocampus

Two-way ANOVA of the CREB levels in the hippocampus demonstrated a significant effect of Wine X  $Ldlr^{-/-}$  interaction ( $F_{1,24} = 4.76$ ,  $p < 0.05$ ). Post hoc comparisons revealed that the  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group has a significantly decrease of the CREB levels compared to control group ( $p < 0.01$ ). Wine treatment significantly increased the CREB levels compared to  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group, returning to control levels (Fig. 6C).

### 3.6.4 CREB levels in the prefrontal cortex

Statistical analysis of the CREB levels in the prefrontal cortex showed a significant effect of wine ( $F_{1,24} = 13.32$ ,  $p < 0.003$ ),  $Ldlr^{-/-}$  ( $F_{1,24} = 9.55$ ,  $p < 0.009$ ). Post hoc comparisons demonstrated that the  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group has a significantly decrease of the CREB levels compared to control group ( $p < 0.01$ ). The wine treatment significantly increased CREB levels compared to  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group, returning to control group levels (Fig. 6D).

## 3.7 miR 146a and miR 155 levels

### 3.7.1 miR 146a levels in the hippocampus

Two-way ANOVA of the miR 146a levels in the hippocampus demonstrated a significant effect of wine ( $F_{1,24} = 19.55$ ,  $p < 0.001$ ),  $Ldlr^{-/-}$  ( $F_{1,24} = 63.18$ ,  $p < 0.001$ ) and Wine X  $Ldlr^{-/-}$  interaction ( $F_{1,24} = 6.23$ ,  $p < 0.04$ ). Post hoc comparisons revealed that the  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group has a significantly decrease of the miR 146a levels compared to control group ( $p < 0.001$ ). The wine treatment significantly increased the miR 146a levels compared to  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group, however did not return to control levels (Fig. 7A).

### 3.7.2 miR 146a levels in the prefrontal cortex

Statistical analysis of the miR 146a levels in the prefrontal cortex showed a significant effect of wine ( $F_{1,24} = 9.21, p < 0.01$ ),  $Ldlr^{-/-}$  ( $F_{1,24} = 18.67, p < 0.001$ ) and wine X  $Ldlr^{-/-}$  interaction ( $F_{1,24} = 0.29, p < 0.60$ ). Post hoc comparisons demonstrated that the  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group has a significantly decrease of the miR 146a levels compared to control group ( $p < 0.01$ ). Wine treatment partially restored the increased of miR 146a levels compared to  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group (Fig. 7B).

### 3.7.3 miR 155 levels in the hippocampus

Two-way ANOVA of the miR 155 levels in the hippocampus demonstrated a significant effect of wine ( $F_{1,24} = 18.14, p < 0.001$ ),  $Ldlr^{-/-}$  ( $F_{1,24} = 7.31, p < 0.01$ ) and Wine X  $Ldlr^{-/-}$  interaction ( $F_{1,24} = 8.43, p < 0.01$ ). Post hoc comparisons showed that the  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group has a significantly decrease of the miR 155 levels compared to control group ( $p < 0.01$ ). Wine treatment significantly increased the miR 155 levels compared to  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group, returning to control levels (Fig. 7C).

### 3.7.4 miR 155 levels in the prefrontal cortex

Statistical analysis of the miR 155 levels in the prefrontal cortex showed a significant effect of wine ( $F_{1,24} = 9.03, p < 0.01$ ) and  $Ldlr^{-/-}$  ( $F_{1,24} = 27.23, p < 0.001$ ). Post hoc comparisons demonstrated that the  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group has a significantly decrease of the miR 155 levels compared to control group ( $p < 0.01$ ). The chronic treatment with wine significantly increased miR 155 levels compared to  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle group, but did not return to control Wild/Vehicle group levels (Fig. 7D).

## 4 Discussion

In our study, the hypercholesterolemic diet administered in mice C57BJ/6  $Ldlr^{-/-}$  led to the increase in lipid markers and promoting neuroinflammation, in parallel, occurred the deregulation of synaptic plasticity and incidence of memory losses. Moderate consumption of Ruby Cabernet red wine demonstrated efficacy on neuroinflammation concomitant with cognitive deficit. We investigated the effects of wine on the behavioral parameters (Morris water maze task), changes in brain structures (AChE, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and levels of BDNF, CREB, miR-146a and miR 155) and blood markers (TG, TC, HDL, LDL, Ox-LDL and AI).



Ruby Cabernet wine (2009) demonstrated its antioxidant potential, with higher concentrations of gallic acid 135.3 mg/L and epicatechin 242.2 mg/L compared to Spanish wines studied by García-Falcón et al. (2007) 7-14 mg/L gallic acid and 2-20 mg/L epicatechin. The concentration of caffeic acid 91.2 mg/L was also higher compared to Argentine wines Malbec and Cabernet Sauvignon, which showed 3.0-3.3 mg/L of caffeic acid (FANZONE et al., 2012). Ruby Cabernet wine produced in the city of Itaquí RS presented concentrations of resveratrol 102.2 mg/L and anthocyanins 68.2 mg/L, as well as Van Leeuw et al. (2014) in a study with a diversity of wines in Belgium that obtained 3.11 mg/L of resveratrol and 86.9 mg/L of anthocyanins in Pinot Noir wine. The content of total polyphenols in the studied wine was 4.59 mg/L GAE, a similar result showed Pazzini et al. (2015) with 4.410 mg/L GAE of total polyphenols in the Tannat wine produced in the same region of the Western Border of R.S.

Hypercholesterolemia promotes inflammation against lipoproteins and the generation of proinflammatory cytokines (MAILER et al., 2017). Our data indicate that knockout mice with LDL receptor ( $Ldlr^{-/-}$ ) fed a high cholesterol diet induces a dramatic increase in the levels of serum lipid markers (TG, TC, LDL, Ox-LDL and A.I.). In contrast, red wine reversed these indices, as well as increased HDL, demonstrating its protective potential, due to the action of polyphenolic compounds, as was also expressed by Schrieks et al., 2012. It was previously reported that there is a correspondence between the antioxidant activity and the total phenol content present in red wine (Staško et al., 2008). Among these, we highlight the resveratrol that has preventive action to damage the lipid profile and lipoprotein metabolism. (ZORTEA et al., 2016). As well as, epicatechin, a flavonoid with rich antioxidant activity in the inhibition of LDL cholesterol (DE ROSSO et al., 2015).

The diet with high cholesterolemic index induces systemic inflammatory processes and a decline in cognitive functions correlated with learning and memory impairment (EL-KADER & AL-JIFFRI, 2016). The present study found that hypercholesterolemic mice had a decline in cognitive function, especially with regard to memory deficits as measured by the MWM test, similar results were described by Thirumangalakudi et al (2008), in which animals with hypercholesterolemia suffered neuroinflammatory alterations, which played a primary role in cognitive dysfunction. Previous evidence related to neurodegeneration and cognitive deficit as consequences of high cholesterol diet (KUO et al., 2015). However, our results indicate that the consumption of 400  $\mu$ L of Ruby Cabernet red wine was able to reverse the memory damage caused by the hypercholesterolemic diet. According to Wang et al. (2006), which

corroborates our results, reinforces that the flavonoids present in red wine are able to mitigate the damages to spatial memory in knockout mice.

Considering the link between spatial memory deficit and altered cholinergic activity modulated by the hypercholesterolemia diet (Lopes et al., 2015), in our study we analyzed the activity of AChE enzyme in the hippocampus and prefrontal cortex, because this enzyme has the function of modulating the levels of acetylcholine in the synaptic cleft. It was verified that the hyperlipidemic diet increased the activity of this enzyme, as also reported by Schmatz et al. (2009) and Sanchez-Chavez and Salceda (2000) in a diabetic model, impairing cognitive functions and memory. Antagonistically mice that consumed red wine demonstrated a decline in AChE activity, suggesting that antioxidant compounds in wine act to prevent cholinergic dysfunction and memory deficits. Several studies indicate that resveratrol protects against lipid peroxidation by increasing the antioxidant defensive capacity in the brain (KUMAR et al., 2007; SCHMATZ et al., 2009).

Highly correlated with behavioral modifications, mice exposed to a high cholesterolemic diet had high levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 in the hippocampus and prefrontal cortex. Increased expression of proinflammatory cytokines is a feature widely verified by negatively affecting the cognitive process and memory (HOPPERTON et al., 2017). Reinforcing this hypothesis, our study demonstrated that overproduction of proinflammatory cytokines is linked to deregulation of lipid markers, resulting in learning and memory deficits. Thus, we suggest that wine acts on the regulation of cytokines through the attenuation of the inflammatory state. It has been reported that compounds associated with wine act positively on inflammatory mediators and therefore protect memory-related cognitive disorder (WANG et al., 2016). In addition, flavonoid-rich wine has positive effects on cognitive function, reducing the risk of diseases such as Alzheimer's and dementia in general (NURK et al., 2009).

Our study also showed that the effect of the hypercholesterolemic diet acts on the decrease of BDNF levels in the hippocampus and prefrontal cortex, inducing cognitive dysfunction, neuroinflammation and impairment of learning and memory, similar results were found by Park et al. (2010), who observed that the hyperlipidic diet impairs neurogenesis by increasing lipid peroxidation and decreasing BDNF. BDNF is known to promote morphological changes in synapses and plays an important role as underlying learning and memory maintenance (Barco et al., 2006). On the other hand, moderate intake of red wine promoted the elevation of BDNF levels in *Ldlr*<sup>-/-</sup> animals, a similar result was found by Liu et al. (2014), where resveratrol prevented the reduction of levels of BDNF produced by stress protocol, as well as,

Stringer et al. (2015), describes that flavonoid epicatechin demonstrated ability to increase BDNF levels.

It is known that neuroinflammation and changes in BDNF levels may subsequently affect phosphorylation and synthesis of molecules linked to plasticity and synaptic cognition, such as CREB (PARK et al., 2010), the hypercholesterolemic diet also entails deregulation of the structural protein CREB (LI et al., 2015), a hypothesis analogous to our results. However, wine consumption protected the decline of CREB levels in the hippocampus and prefrontal cortex, an equivalent result was found by Simão et al. (2012), who analyzed the parameter CREB in the treatment with resveratrol, constituent majority in grapes.

Our study demonstrated that the diet with a high cholesterol content besides triggering inflammatory processes, diminished the expression of the biomarkers miR-146a and miR-155. These results are connivant with Murugaiyan et al. (2011) that associates miR-155 with the development of inflammation in the CNS, providing memory damage. Adds O'connell et al. (2010) demonstrated that the dysregulation of miRNAs function is related to numerous human diseases, including cancer and many inflammatory diseases. Red wine administration in the experimental models elevated the expression of miR-146a and miR-155, evidencing that these biomarkers have anti-inflammatory properties. Another study shows that miR-155 has potent up-regulation in multiple immune cell lines, providing systemic protection (SPOERL et al., 2013). In addition, miR-146a significantly reduces the accumulation of intracellular LDL cholesterol and negatively regulates immune and inflammatory responses (NAKASA et al., 2011; BLADÉ et al., 2013). Resveratrol treatment stimulates the miRNAs that mediate synaptic plasticity and memory formation along with the positive expression of CREB and BDNF (ZHAO et al., 2013). This information is confirmed by the positive correlation observed between the time in correct quadrant and the expression of the BDNF, CREB, miR-146 $\alpha$ , miR-155 in the hippocampus and prefrontal cortex.

## **5 Conclusion**

The Ruby Cabernet wine produced in the Western Border of the R.S. showed high levels of bioactive in its constitution, characterizing a good antioxidant capacity. The wine is capable of attenuating plasma lipid markers and regular as pro-inflammatory cytokines through the intervention of polyphenols from non-inflammatory wine. In addition, moderate consumption of red wine age modulating the microRNA-CREB-BDNF mechanism and decreasing an action of AChE. With this, the Ruby Cabernet wine produced in Itaquí R.S. was

able to revert to the neurochemicals, attenuate the picture of neuroinflammation and regulate the synaptic plasticity, improving the memory deficit.

## 6 Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge financial support received from FAPERGS 16/2551-0000526-5 e (PRONUPEQ) e #16/2251-0000183-9 (ARD/PPP) and Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA).

## 7 References

Barco, A., Bailey, C. H., & Kandel, E. R. (2006). Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *Journal of neurochemistry*, 97(6), 1520-1533.

Bladé, C., Baselga-Escudero, L., Salvadó, M. J., & Arola-Arnal, A. (2013). miRNAs, polyphenols, and chronic disease. *Molecular nutrition & food research*, 57(1), 58-70.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Caruana, M., Cauchi, R., & Vassallo, N. (2016). Putative role of red wine polyphenols against brain pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Frontiers in nutrition*, 3, 1-16.

De Rosso, M., Panighel, A., Vedova, A. D., Gardiman, M., & Flamini, R. (2015). Characterization of non-anthocyanic flavonoids in some hybrid red grape extracts potentially interesting for industrial uses. *Molecules*, 20(10), 18095-18106.

El-Kader, S. M. A., & Al-Jiffri, O. H. (2016). Aerobic exercise improves quality of life, psychological well-being and systemic inflammation in subjects with Alzheimer's disease. *African health sciences*, 16(4), 1045-1055.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 21(19), 88-95.

Fanzone, M., Peña-Neira, A., Gil, M., Jofré, V., Assof, M., & Zamora, F. (2012). Impact of phenolic and polysaccharidic composition on commercial value of Argentinean Malbec and Cabernet Sauvignon wines. *Food Research International*, 45(1), 402-414.

García-Falcón, M. S., Pérez-Lamela, C., Martínez-Carballo, E., & Simal-Gándara, J. (2007). Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chemistry*, 105(1), 248-259.

Guo, H., Cheng, Y., Wang, C., Wu, J., Zou, Z., Niu, B., Yu, H., Wang, H. & Xu, J. (2017). FFPM, a PDE4 inhibitor, reverses learning and memory deficits in APP/PS1 transgenic mice via cAMP/PKA/CREB signaling and anti-inflammatory effects. *Neuropharmacology*, 116, 260-269.

Hopperton, K. E., Mohammad, D., Trépanier, M. O., Giuliano, V., & Bazinet, R. P. (2017). Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer's disease: a systematic review. *Molecular psychiatry*. (00),1-22 doi: 10.1038/MP.2017.246

Junior, G. S. M., Souza, V. C., Machado-Silva, W., Henriques, A. D., Alves, A. M., Morais, D. B., Nóbrega, O.T., Brito, C.J. & dos Santos Silva, R. J. (2017). Acute strength training promotes responses in whole blood circulating levels of miR-146a among older adults with type 2 diabetes mellitus. *Clinical interventions in aging*, 12, 1443.

Kumar, A., Kaundal, R. K., Iyer, S., & Sharma, S. S. (2007). Effects of resveratrol on nerve functions, oxidative stress and DNA fragmentation in experimental diabetic neuropathy. *Life sciences*, 80(13), 1236-1244.

Kuo, P. H., Lin, C. I., Chen, Y. H., Chiu, W. C., & Lin, S. H. (2015). A high-cholesterol diet enriched with polyphenols from Oriental plums (*Prunus salicina*) improves cognitive function and lowers brain cholesterol levels and neurodegenerative-related protein expression in mice. *British Journal of Nutrition*, 113(10), 1550-1557.

Lees, D. H., & Francis, F. J. (1972). Standardization of pigment analyses in cranberries. *HortScience*.

Li, Z., Yu, X., Wang, Y., Shen, J., Wu, W. K. K., Liang, J., & Feng, F. (2015). By downregulating TIAM1 expression, microRNA-329 suppresses gastric cancer invasion and growth. *Oncotarget*, 6(19), 17559.

Liu, D., Zhang, Q., Gu, J., Wang, X., Xie, K., Xian, X., Wang, J., Jiang, H. & Wang, Z. (2014). Resveratrol prevents impaired cognition induced by chronic unpredictable mild stress in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 49, 21-29.

Lopes, J. B., de Oliveira, J., Engel, D. F., de Paula, G. C., Moreira, E. L., & de Bem, A. F. (2015). Efficacy of Donepezil for Cognitive Impairments in Familial Hypercholesterolemia: Preclinical Proof of Concept. *CNS neuroscience & therapeutics*, 21(12), 964-966.

Mailer, R. K., Gisterå, A., Polyzos, K. A., Ketelhuth, D. F., & Hansson, G. K. (2017). Hypercholesterolemia Enhances T Cell Receptor Signaling and Increases the Regulatory T Cell Population. *Scientific Reports*, 7(1), 15655.

Morris, R.G.M.; Garrud, P.; Rawlins, J.N.P.; O'keefe, J. (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* n.297, p.681–683.

Muñoz-González, I., Thurnheer, T., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2014). Red wine and oenological extracts display antimicrobial effects in an oral bacteria biofilm model. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(20), 4731-4737.

Murugaiyan, G., Beynon, V., Mittal, A., Joller, N., & Weiner, H. L. (2011). Silencing microRNA-155 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 187(5), 2213-2221.

Nakasa, T., Shibuya, H., Nagata, Y., Niimoto, T., & Ochi, M. (2011). The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 63(6), 1582-1590.

Nurk, E., Refsum, H., Drevon, C. A., Tell, G. S., Nygaard, H. A., Engedal, K., & Smith, A. D. (2009). Intake of flavonoid-rich wine, tea, and chocolate by elderly men and women is associated with better cognitive test performance. *The Journal of nutrition*, 139(1), 120-127.

O'connell, R. M., Kahn, D., Gibson, W. S., Round, J. L., Scholz, R. L., Chaudhuri, A. A., Kahn, M. E., Rao, D. S. & Baltimore, D. (2010). MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity*, 33(4), 607-619.

Park, H. R., Park, M., Choi, J., Park, K. Y., Chung, H. Y., & Lee, J. (2010). A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience letters*, 482(3), 235-239.

Pazzini, C. E. F., Colpo, A. C., Poetini, M. R., Pires, C. F., de Camargo, V. B., Mendez, A. S. L., Azevedo, M. L., Soares, J. C. M. & Folmer, V. (2015). Effects of red wine tannat on oxidative stress induced by glucose and fructose in erythrocytes in vitro. *International journal of medical sciences*, 12(6), 478.

Prediger, R. D., Franco, J. L., Pandolfo, P., Medeiros, R., Duarte, F. S., Di Giunta, G., Figueiredo, C. P., Farina, M., Calixto, J. B., Takahashi, R. N. & Dafre, A. L. (2007). Differential susceptibility following  $\beta$ -amyloid peptide-(1–40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. *Behavioural brain research*, 177(2), 205-213.

Quirós AR, López-Hernández J, Ferraces-Casais P., & Lage-Yusty, M. A. (2007). Analysis of non-anthocyanin phenolic compounds in wine samples using high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *Journal of separation science*, 30(9), 1262-1266.

Reagan-Shaw, S., Nihal, M., & Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB journal*, 22(3), 659-661.

Rocha, J.B.T.; Emanuelli, T.; Pereira, M.E. (1993) Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. *Acta Neurobiological Experimentalis*, n.53, p.431-437.

Sánchez-Chávez, G., & Salceda, R. (2000). Effect of Streptozotocin-Induced Diabetes on Activities of Cholinesterases in the Rat Retina. *IUBMB life*, 49(4), 283-287.

Schmatz, R., Mazzanti, C. M., Spanevello, R., Stefanello, N., Gutierrez, J., Corrêa, M., Rosa, M. M., Rubin, M. A., Schetinger, M. R. C. & Morsch, V. M. (2009). Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *European journal of pharmacology*, 610(1), 42-48.

Schriecks, I. C., van den Berg, R., Sierksma, A., Beulens, J. W., Vaes, W. H., & Hendriks, H. F. (2012). Effect of red wine consumption on biomarkers of oxidative stress. *Alcohol and alcoholism*, 48(2), 153-159.

Simão, F., Matté, A., Pagnussat, A. S., Netto, C. A., & Salbego, C. G. (2012). Resveratrol prevents CA1 neurons against ischemic injury by parallel modulation of both GSK-3 $\beta$  and CREB through PI3-K/Akt pathways. *European Journal of Neuroscience*, 36(7), 2899-2905.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

Spoerl, D., Duroux-Richard, I., Louis-Pence, P., & Jorgensen, C. (2013). The role of miR-155 in regulatory T cells and rheumatoid arthritis. *Clinical Immunology*, 148(1), 56-65.

Stasko, J., Görg, C., & Liu, Z. (2008). Jigsaw: supporting investigative analysis through interactive visualization. *Information visualization*, 7(2), 118-132.

Stringer, T. P., Guerrieri, D., Vivar, C., & Van Praag, H. (2015). Plant-derived flavanol (-) epicatechin mitigates anxiety in association with elevated hippocampal



monoamine and BDNF levels, but does not influence pattern separation in mice. *Translational psychiatry*, 5(1), e493.

Thirumangalakudi, L., Prakasam, A., Zhang, R., Bimonte-Nelson, H., Sambamurti, K., Kindy, M. S., & Bhat, N. R. (2008). High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. *Journal of neurochemistry*, 106(1), 475-485.

Tomazetti, T. C., Rossarolla, M. D., Zeist, A. R., Giacobbo, C. L., Welter, L. J., & Alberto, C. M. (2015). Fenologia e acúmulo térmico em videiras viníferas na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 50(11), 1033-1041.

Van Leeuw, R., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommes, J. (2014). Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of Pinot Noir. *Journal of Food Composition and Analysis*, 36(1), 40-50.

Wang, G., Chen, L., Pan, X., Chen, J., Wang, L., Wang, W., Cheng, R., Wu, F., Feng, X., Yu, Y., Zhang, H. T., O'donnell, J. M. & Xu, Y. (2016). The effect of resveratrol on beta amyloid-induced memory impairment involves inhibition of phosphodiesterase-4 related signaling. *Oncotarget*, 7(14), 17380.

Wang, J., Ho, L., Zhao, Z., Seror, I., Humala, N., Dickstein, D. L., Thiyagarajan, M., Percival, S. S., Talcott, S. T. & Pasinetti, G. M. (2006). Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates A $\beta$  neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*, 20(13), 2313-2320.

Wu, H., Liu, Q., Kalavagunta, P. K., Huang, Q., Lv, W., An, X., Chen, H., Wang, T., Heriniaina, R., M., Qiao, T., & Shang, J. (2017). Normal diet Vs High fat diet-A comparative study: Behavioral and neuroimmunological changes in adolescent male mice. *Metabolic brain disease*, 1-14.

Zhao, Y. N., Li, W. F., Li, F., Zhang, Z., Dai, Y. D., Xu, A. L., Qi, C., Goa, J. M. & Gao, J. (2013). Resveratrol improves learning and memory in normally aged mice through

microRNA-CREB pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 435(4), 597-602.

Zorteza, K., Franco, V. C., Francesconi, L. P., Cereser, K. M., Lobato, M. I. R., & Belmonte-de-Abreu, P. S. (2016). Resveratrol Supplementation in Schizophrenia Patients: A Randomized Clinical Trial Evaluating Serum Glucose and Cardiovascular Risk Factors. *Nutrients*, 8(2), 73.

## Figure legends

### Figure 1: Experimental design.

**Figure 2:** Effects of red wine treatment during ninety days in TG (A), TC (B), HDL (C), LDL (D), oxLDL (E) and A.I. (F) levels in blood plasma of mice. Values are mean  $\pm$  S.E.M. (n = 10 per group). \*: p < 0.05 when compared wild/vehicle \*\*: p < 0.01; when compared wild/vehicle \*\*\*: p < 0.001 when compared wild/vehicle; #: p < 0.05 when compared with Ldlr<sup>-/-</sup>/vehicle; \$: p < 0.05 when compared with wild/wine (Two-way ANOVA and Post hoc test).

**Figure 3:** (A) Effect of red wine treatment on the MWMT test with time in the correct quadrant (A) and (B) latency to target platform location. Test was realized 24 h after to treatment. Values are mean  $\pm$  S.E.M. (n = 10 per group). \*\*: p < 0.01; when compared wild/vehicle \*\*\*: p < 0.001 when compared wild/vehicle; #: p < 0.05 when compared with Ldlr<sup>-/-</sup>/vehicle; \$: p < 0.05 when compared with wild/wine (Two-way ANOVA and Post hoc test).

**Figure 4:** Effects of red wine treatment on AChE activity in the hippocampus (A) and in the prefrontal cortex (B) of mice. Values are mean  $\pm$  S.E.M. (n = 10 per group). \*\*: p < 0.01; when compared wild/vehicle; #: p < 0.05 when compared with Ldlr<sup>-/-</sup>/vehicle; \$: p < 0.05 when compared with wild/wine (Two-way ANOVA and Post hoc test).

**Figure 5:** Effects of red wine treatment during ninety days in the TNF $\alpha$  (A and B), IL-1 $\beta$  (C and D), IL-6 (E and F) and INF $\gamma$  (G and H) levels in hippocampus and prefrontal cortex of mice. Values are mean  $\pm$  S.E.M. (n = 10 per group). \*: p < 0.05 when compared wild/vehicle; \*\*\*: p < 0.001 when compared wild/vehicle; #: p < 0.05 when compared with Ldlr<sup>-/-</sup>/vehicle; \$: p < 0.05 when compared with wild/wine (Two-way ANOVA and Post hoc test).

**Figure 6:** Effects of red wine treatment on BDNF levels in hippocampus (A) and in the prefrontal cortex (B); protein CREB in hippocampus (C) and in the prefrontal cortex (D) of mice. Values are mean  $\pm$  S.E.M. (n = 10 per group). \*\*: p < 0.01; when compared wild/vehicle \*\*\*: p < 0.001 when compared wild/vehicle; #: p < 0.05 when compared with Ldlr<sup>-/-</sup>/vehicle; (Two-way ANOVA and Post hoc test).

**Figure 7:** Effects of red wine treatment on miRNA 146a in the hippocampus (A) and in the prefrontal cortex (B); miRNA 155 in the hippocampus (C) and in the prefrontal cortex (D) of mice. Values are mean  $\pm$  S.E.M. (n = 10 per group). \*\*: p < 0.01; when compared wild/vehicle \*\*\*: p < 0.001 when compared wild/vehicle; #: p < 0.05 when compared with  $Ldlr^{-/-}$ /vehicle; \$: p < 0.05 when compared with wild/wine (Two-way ANOVA and Post hoc test).

**Figure 8:** Diagram showing the mechanism between neuroinflammation and neurobehavioral disorders induced by hypercholesterolemic diet and the effect of moderate consumption of Ruby Cabernet red wine on  $Ldlr^{-/-}$  mice. (+) increase; (-) decrease; ( $\neq$ ) different; underlined: mechanisms demonstrated in this study. The hypercholesterolemic diet administered in knockout mice triggered increased plasma lipid levels and proinflammatory cytokines, decreased neurotrophic factors (BDNF, CREB and microRNA), providing the animals with memory deficits analyzed by the behavioral test. Moderate consumption of Ruby Cabernet red wine reversed lipid levels and proinflammatory cytokines, protecting against neuroinflammatory damage.

**Figures:**

**Figure 1:**

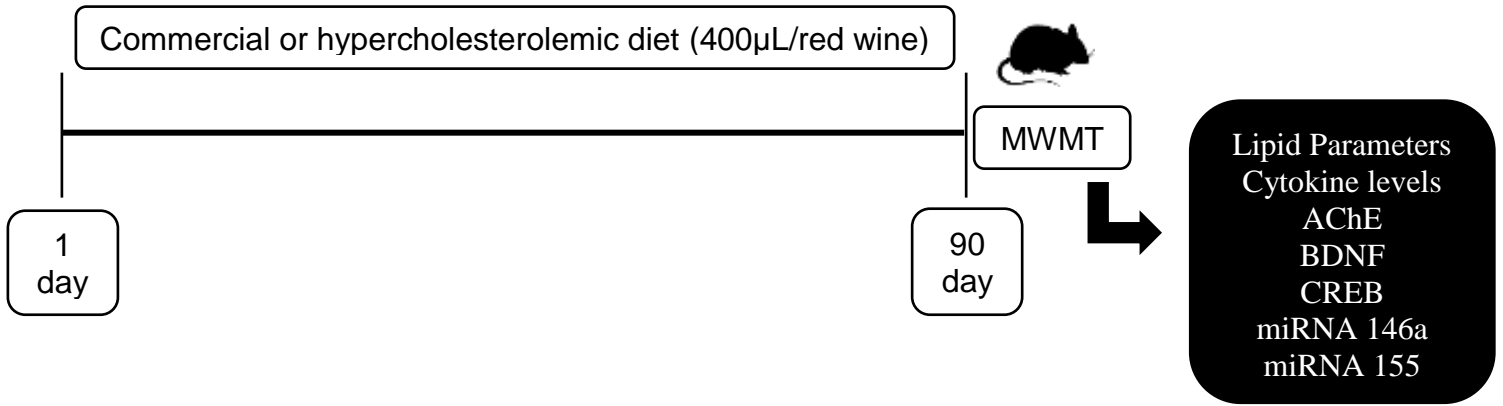


Fig. 1. Experimental design

Figure 2:

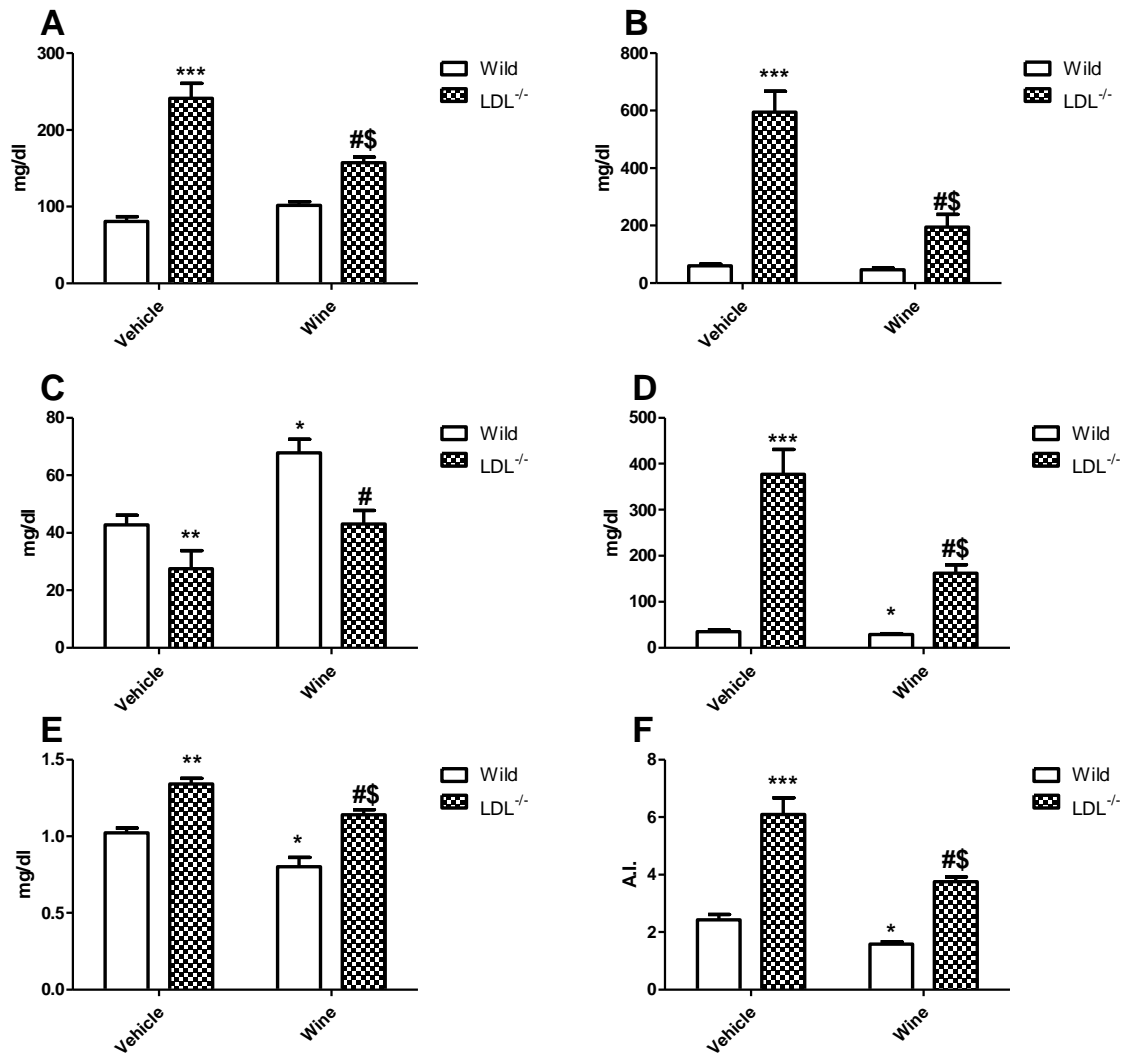


Figure 3:

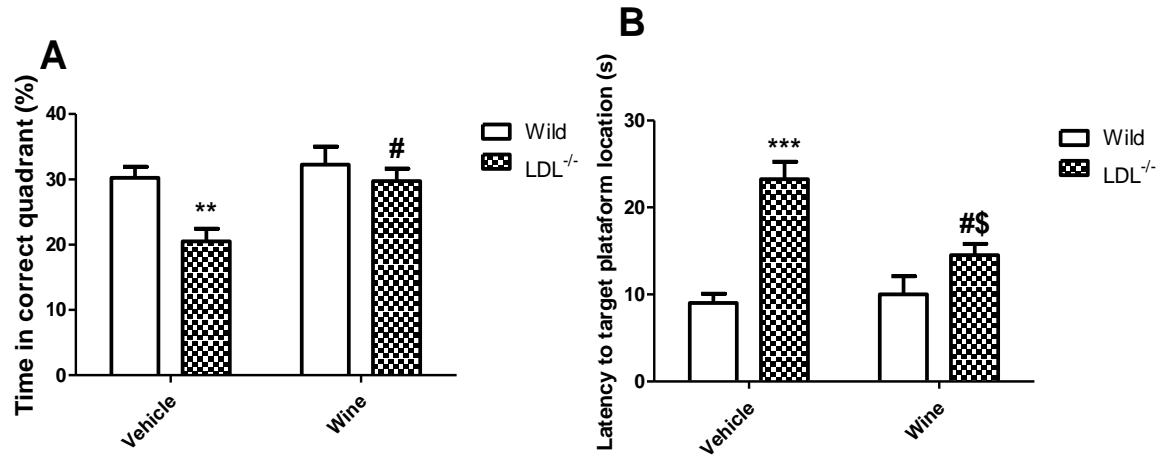


Figure 4:

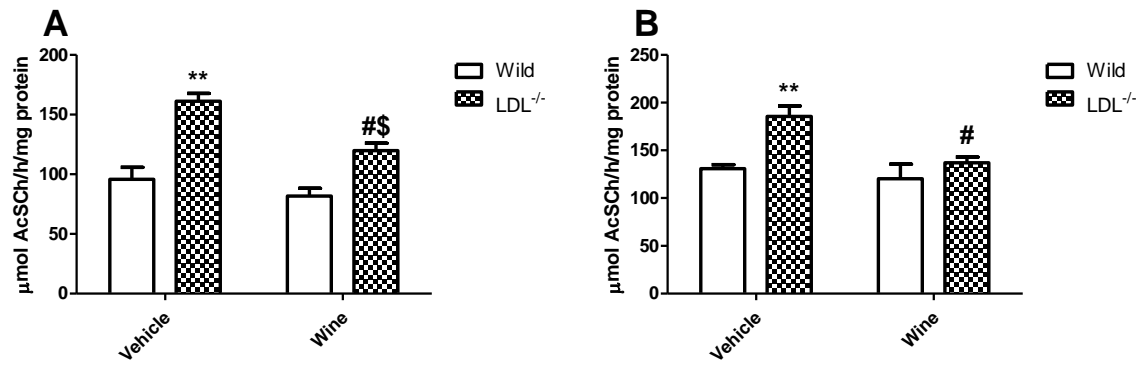




Figure 5:

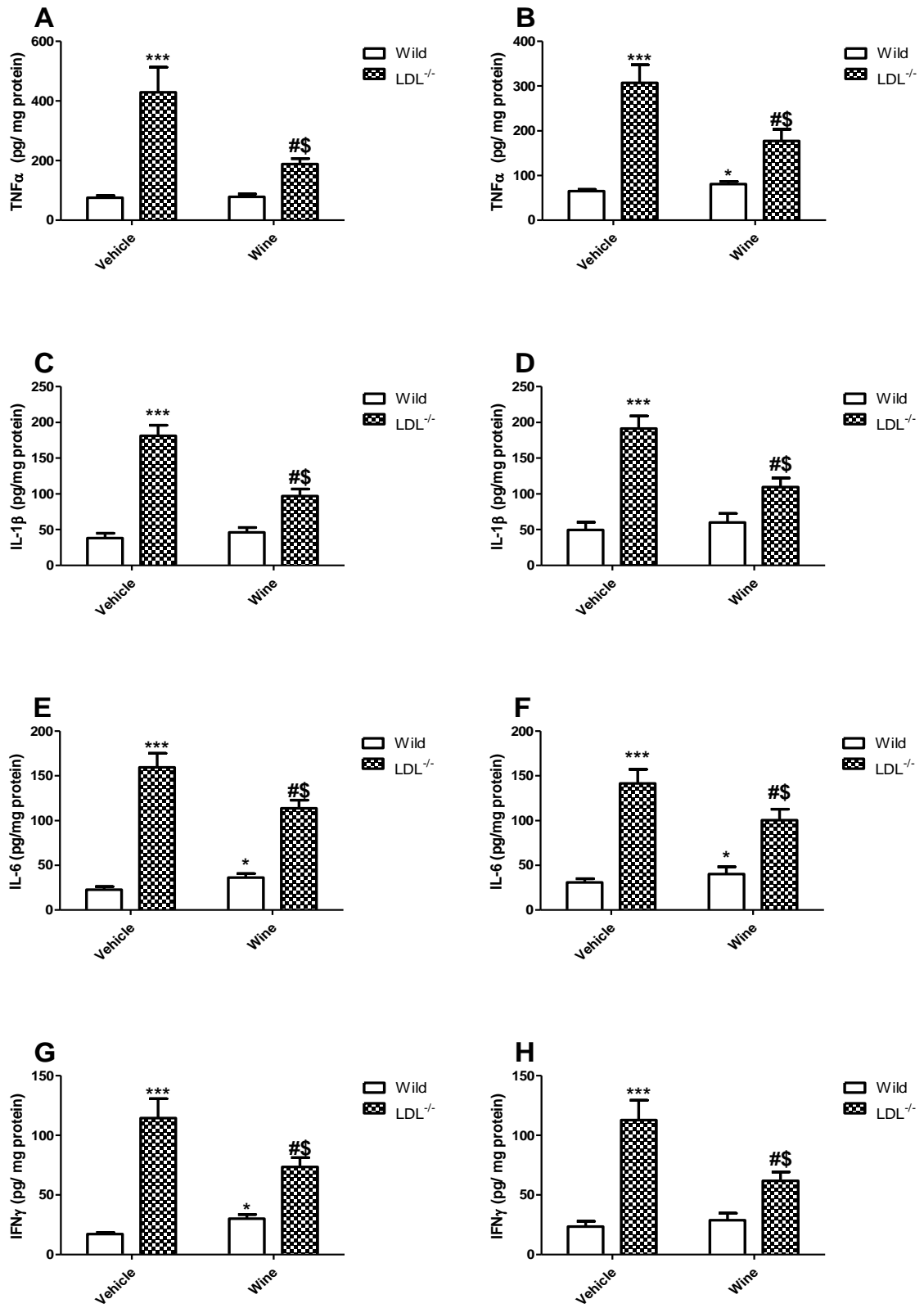


Figure 6:

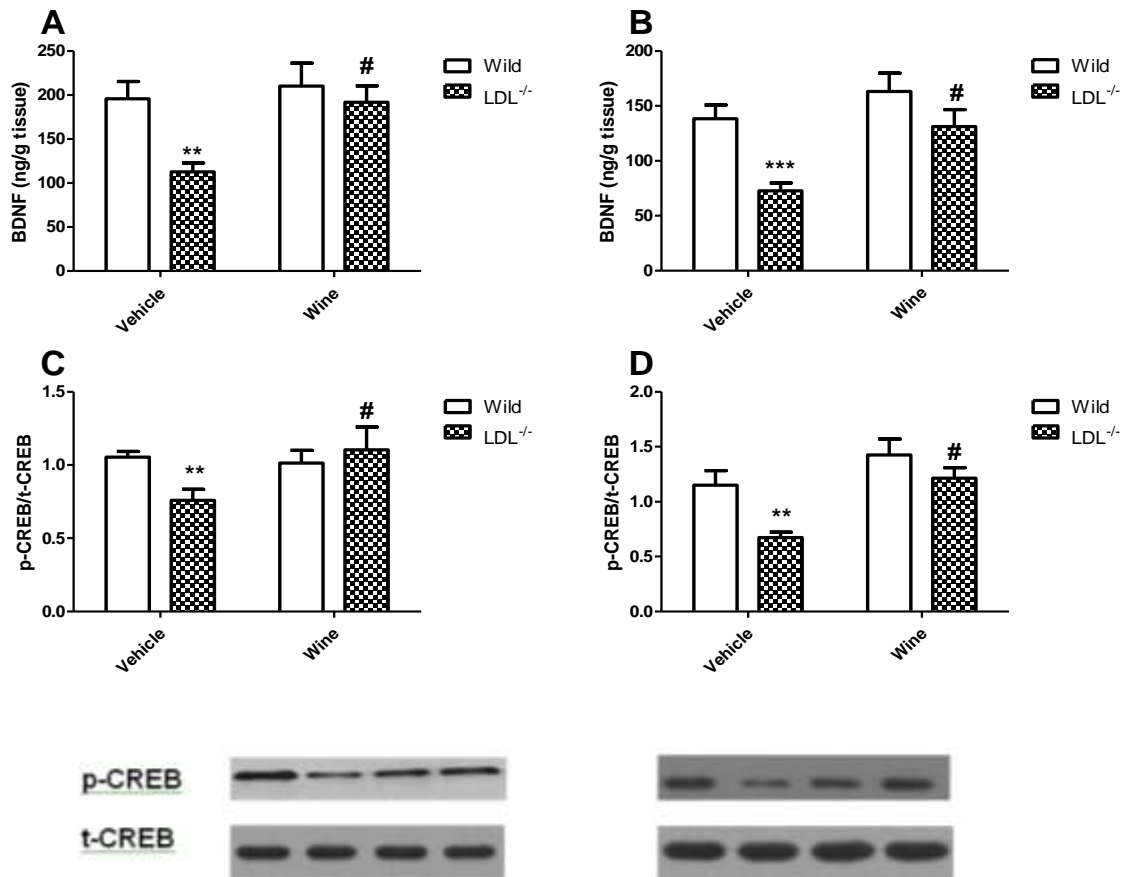
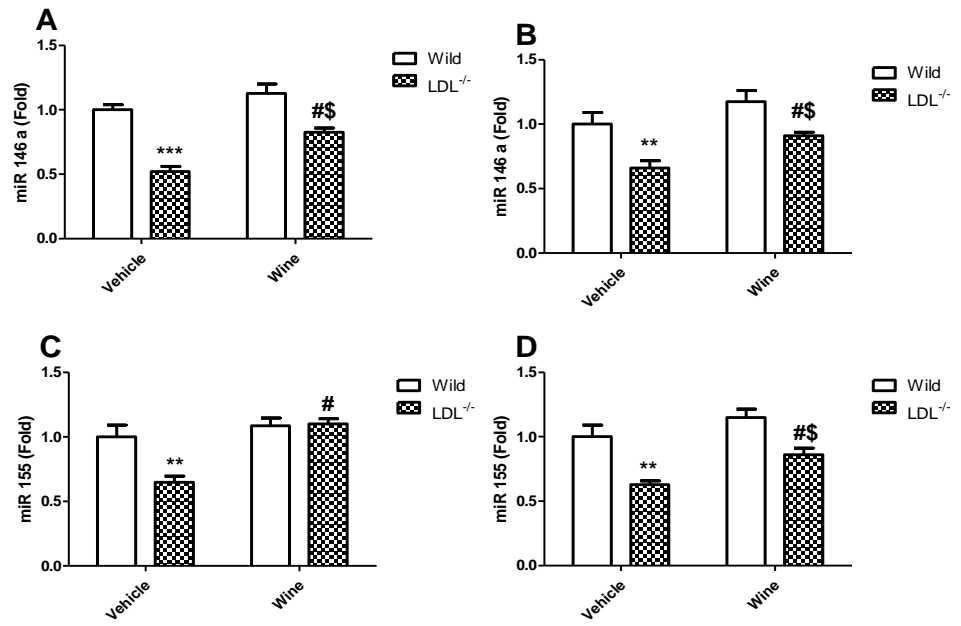
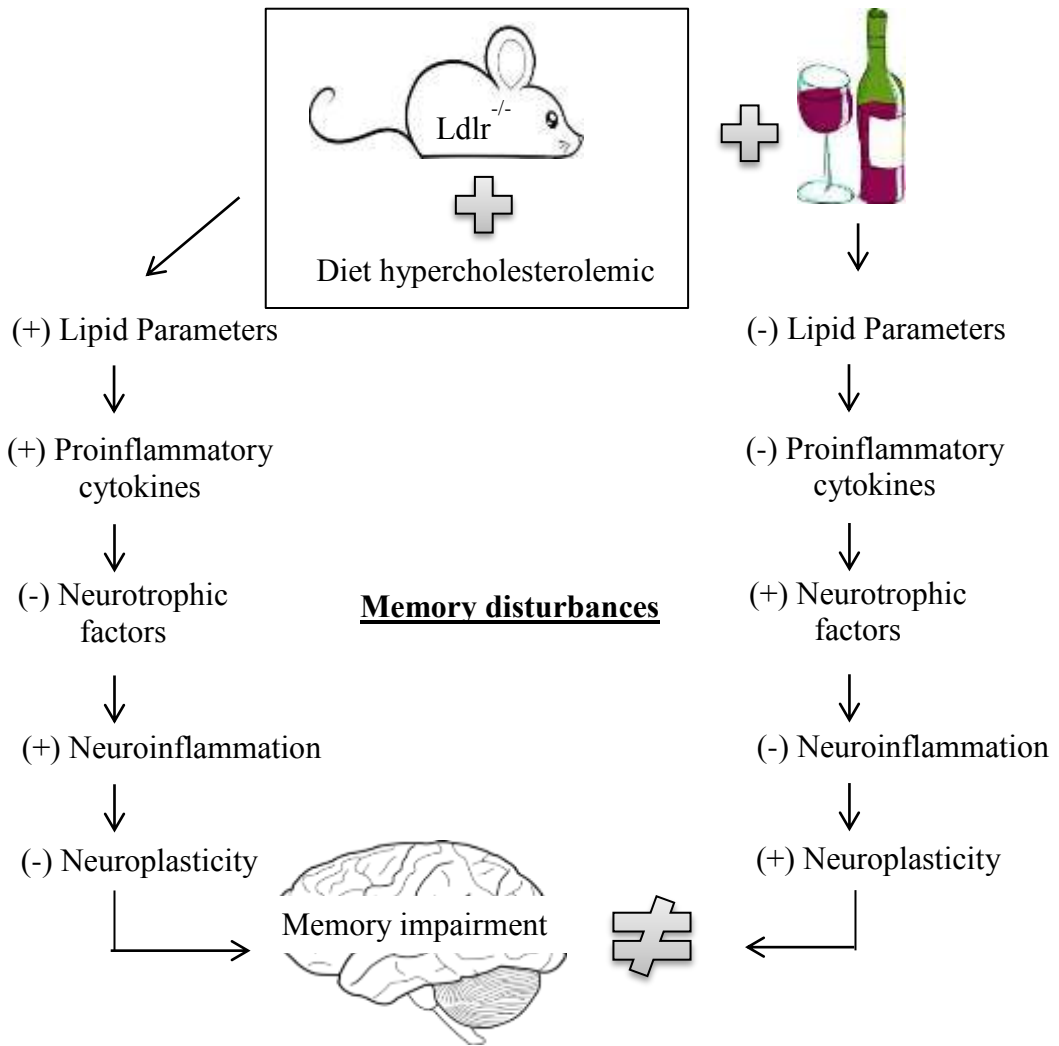


Figure 7:



**Figure 8:**



**Table 1.** r values resulting from Pearson's correlation test for neurochemical factors, behavioral and plasmatic parameters

	<b>TG</b>	<b>TC</b>	<b>HDL</b>	<b>LDL</b>	<b>oxLDL</b>	<b>AI</b>	<b>Memory 1</b>	<b>Memory 2</b>
<b>AChE</b>	HP= 0.89* PFC= 0.77*	HP= 0.84* PFC= 0.75*	HP= -0.80* PFC= -0.68*	HP= 0.82* PFC= 0.73*	HP= 0.78* PFC= 0.68*	HP= 0.83* PFC= 0.68*	HP= -0.66* PFC= -0.84*	HP= 0.74* PFC= 0.77*
<b>TNF-<math>\alpha</math> levels</b>	HP= 0.89* PFC= 0.93*	HP= 0.87* PFC= 0.88*	HP= -0.71* PFC= -0.64*	HP= 0.85* PFC= 0.85*	HP= 0.74* PFC= 0.75*	HP= 0.79* PFC= 0.82*	HP= -0.58* PFC= -0.57*	HP= 0.79* PFC= 0.79*
<b>IL-1<math>\beta</math> levels</b>	HP= 0.87* PFC= 0.84*	HP= 0.86* PFC= 0.81*	HP= -0.51* PFC= -0.46	HP= 0.87* PFC= 0.80*	HP= 0.77* PFC= 0.79*	HP= 0.92* PFC= 0.85*	HP= -0.74* PFC= -0.77*	HP= 0.84* PFC= 0.74*
<b>IL-6 levels</b>	PFC= 0.95* HP= 0.88*	PFC= 0.81* HP= 0.84*	PFC= -0.64* HP= -0.59*	PFC= 0.86* HP= 0.93*	PFC= 0.77* HP= 0.71*	PFC= 0.79* HP= 0.86*	PFC= -0.61* HP= -0.60*	PFC= 0.78* HP= 0.86*
<b>IFN-<math>\gamma</math> levels</b>	HP= 0.86* PFC= 0.88*	HP= 0.81* PFC= 0.84*	HP= -0.51* PFC= -0.59*	HP= 0.96* PFC= 0.93*	HP= 0.66* PFC= 0.71*	HP= 0.87* PFC= 0.86*	HP= -0.55* PFC= -0.60*	HP= 0.83* PFC= 0.86*
<b>BDNF levels</b>	HP=-0.68* PFC= -0.69*	HP= -0.67* PFC= -0.74*	HP= 0.63* PFC= 0.62*	HP= -0.64* PFC= -0.70*	HP= -0.58* PFC= -0.62*	HP= -0.63* PFC= -0.78*	HP= 0.52* PFC= 0.55*	HP= -0.50* PFC= -0.67*
<b>CREB</b>	HP= -0.68* PFC= -0.53*	HP= -0.69* PFC= -0.47	HP= 0.76* PFC= 0.33	HP= -0.66* PFC= -0.42	HP= -0.68* PFC= -0.35	HP= -0.68* PFC= -0.43	HP= 0.43 PFC= 0.26	HP= -0.58* PFC= -0.28
<b>miR 146 a</b>	HP= -0.83* PFC= -0.63*	HP= -0.89* PFC= -0.80*	HP= 0.72* PFC= 0.73*	HP= -0.88* PFC= -0.69*	HP= -0.83* PFC= -0.84*	HP= -0.92* PFC= -0.78*	HP= 0.58* PFC= 0.73*	HP= -0.76* PFC= -0.59*
<b>miR 155</b>	HP= -0.63* PFC= -0.72	HP= -0.77* PFC= -0.81*	HP= 0.61* PFC= 0.70*	HP= -0.69* PFC= -0.63*	HP= -0.64* PFC= -0.78*	HP= -0.65* PFC= -0.85*	HP= 0.72* PFC= 0.71*	HP= -0.56* PFC= -0.65*

\*denoted  $p < 0.05$ .

## 6 CONCLUSÃO

Podemos inferir, pelos resultados obtidos que o vinho tinto Ruby Cabernet (safra 2009) produzido no município de Itaqui na região da Campanha Oriental possui elevado efeito antioxidante, capaz de reverter o perfil lipídico, a expressão das citocinas pró-inflamatórias e a atividade da enzima AChE, demonstrando seu potencial protetor as inflamações sistêmicas originadas de uma dieta hipercolesterolêmica.

O potencial efeito neuroprotetor do vinho tinto foi refletido nos parâmetros de aprendizagem e memória, assim como protegeu a expressão do mecanismo microRNA-CREB-BDNF a nível cerebral, que corroborara com a eficácia do conteúdo de flavonoides, o qual agrega efeitos positivos ao déficit cognitivo e aos mediadores da plasticidade sináptica.

Com base nos resultados alcançados a cerca do efeito neuroprotetor dos compostos fenólicos, concluí-se que o vinho age como modulador no tratamento de déficits cognitivos.

## 7 PERSPECTIVAS

A fim de alcançar um melhor entendimento sobre os constituintes e os mecanismos de ação do vinho tinto sobre as alterações comportamentais e neurológicas induzidas pela dieta hipercolesterolêmica, este trabalho terá seguimento no doutorado. A seguir, algumas perspectivas:

- Analisar o efeito antioxidante de vinhos tintos produzidos na Fronteira Oeste (RS) com potencial efeito neuroprotetor em camundongos hipercolesterolêmicos, enfatizando em um maior número de testes comportamentais e diferentes microRNAs.
- Avaliar diferentes variedades de uvas (*Vitis vinífera*) e seus compostos fenólicos, bem como nos vinhos da Região da Campanha Oriental, sobre as alterações comportamentais e neurológicas em camundongos obesos, utilizando testes comportamentais diversos, avaliação do estresse oxidativo e expressões da via microRNA-CREB-BDNF.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-AMSHA, R., CROFT, K. D., PUDDEY, I. B., PROUDFOOT, J. M., & BEILIN, L. J. Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low-density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine. **Clinical Science**, v. 91, n. 4, p. 449-458, 1996.

ALEMANY, A. A. S. Influência da dieta hipercolesterolêmica em camundongos nocautes *Ldlr<sup>-/-</sup>* expostos a partículas ambientais concentradas sobre o sistema pulmonar. 88f. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ALSUHAYMI, N., HABEEBALLAH, H., STEBBING, M. J., & BADOER, E. High Fat Diet Decreases Neuronal Activation in the Brain Induced by Resistin and Leptin. **Frontiers in physiology**, v. 8, 2017.

ASSUNÇÃO, M., SANTOS-MARQUES, M. J., CARVALHO, F., & ANDRADE, J. P. Green tea averts age-dependent decline of hippocampal signaling systems related to antioxidant defenses and survival. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 6, p. 831-838, 2010.

BAILEY, S. L., CARPENTIER, P. A., MCMAHON, E. J., BEGOLKA, W. S., & MILLER, S. D. Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 26, n. 2, 2006.

BOITARD, C., CAVAROC, A., SAUVANT, J., AUBERT, A., CASTANON, N., LAYÉ, S., & FERREIRA, G. Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. **Brain, behavior, and immunity**, v. 40, p. 9-17, 2014.

BRIXNER, G. F., MARTINS, C. R., DO AMARAL, U., KÖPP, L. M., & DE OLIVEIRA, D. B. CARACTERIZAÇÃO FENOLÓGICA E EXIGÊNCIA TÉRMICA DE VIDEIRA *Vitis vinifera* CULTIVADAS NO MUNICÍPIO DE URUGUAIANA NA REGIÃO DA FRONTEIRA OESTE-RS. **Revista da FZVA**, v. 17, n. 2, 2010.

BRUNONI, A. R., LOPES, M., & FREGNI, F. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of



neuroplasticity in depression. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 8, p. 1169-1180, 2008.

CACCETTA, R. A. A., CROFT, K. D., BEILIN, L. J., & PUDDEY, I. B. Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability. **The American journal of clinical nutrition**, v. 71, n. 1, p. 67-74, 2000.

CARBÓ, N., COSTELLI, P., BACCINO, F. M., LÓPEZ-SORIANO, F. J., & ARGILÉS, J. M. Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumour growth in a rat tumour model. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 254, n. 3, p. 739-743, 1999.

CARUANA, M., CAUCHI, R. & VASSALLO, N. Putative role of red wine polyphenols against brain pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease. **Frontiers in Nutrition**, v. 3, 2016.

CEPPI, M., PEREIRA, P. M., DUNAND-SAUTHIER, I., BARRAS, E., REITH, W., SANTOS, M. A., & PIERRE, P. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 8, p. 2735-2740, 2009.

CHAUVEAU, F., BOUTIN, H., VAN CAMP, N., DOLLÉ, F., & TAVITIAN, B. Nuclear imaging of neuroinflammation: a comprehensive review of [11C] PK11195 challengers. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 35, n. 12, p. 2304-2319, 2008.

CHIU, H. F., SHEN, Y. C., HUANG, T. Y., VENKATAKRISHNAN, K., & WANG, C. K. Cardioprotective efficacy of red wine extract of onion in healthy hypercholesterolemic subjects. **Phytotherapy research**, v. 30, n. 3, p. 380-385, 2016.

COSTANZO, S., DI CASTELNUOVO, A., DONATI, M. B., IACOVIELLO, L., & DE GAETANO, G. Wine, beer or spirit drinking in relation to fatal and non-fatal cardiovascular events: a meta-analysis. **European journal of epidemiology**, v. 26, n. 11, p. 833-850, 2011.

COVAS, M. I., GAMBERT, P., FITÓ, M., & DE LA TORRE, R. Wine and oxidative stress: up-to-date evidence of the effects of moderate wine consumption on oxidative damage in humans. **Atherosclerosis**, v. 208, n. 2, p. 297-304, 2010.

DALMAZ, C., ALEXANDRE NETTO, C. A memória. **Ciência e Cultura**, v. 56, n. 1, p. 30-31, 2004.

DE LA MONTE, S.M., TONG, M. Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. SUZANNE, M.; TONG, Ming. Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. **Biochemical pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 548-559, 2014.

DE OLIVEIRA, J., HORT, M. A., MOREIRA, E. L. G., GLASER, V., RIBEIRO-DO-VALLE, R. M., PREDIGER, R. D., FARINA, M., LATINI, A & DE BEM, A. F. Positive correlation between elevated plasma cholesterol levels and cognitive impairments in LDL receptor knockout mice: relevance of cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress. **Neuroscience**, v. 197, p. 99-106, 2011.

De Oliveira, L. C., Barcellos, A. D., Machado, B. A. S., & Druzian, J. I. Atividade Antioxidante de Compostos Fenólicos em Vinhos Tintos: Busca em Bases Científicas e Tecnológicas. **Cadernos de Prospecção**, v. 5, n. 4, p. 221, 2014.

DE ROSSO, M., PANIGHEL, A., VEDOVA, A. D., GARDIMAN, M., & FLAMINI, R. Characterization of non-anthocyanic flavonoids in some hybrid red grape extracts potentially interesting for industrial uses. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18095-18106, 2015.

DELCAMBRE, A., SAUCIER, C. Identification of new flavan-3-ol monoglycosides by UHPLC-ESI-Q-TOF in grapes and wine. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 6, p. 727-736, 2012.

EL-KADER, S. M. A. & AL-JIFFRI, O. H. Aerobic exercise improves quality of life, psychological well-being and systemic inflammation in subjects with Alzheimer's disease. **African Health Sciences**, v. 16, n. 4, p. 1045-1055, 2016.

ESTRUCH, R., SACANELLA, E., BADIA, E., ANTÚNEZ, E., NICOLÁS, J. M., FERNÁNDEZ-SOLÁ, J., ROTILIO, D., DE GAETANO, G., RUBIN, E. & URBANO-MÁRQUEZ, A. Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory

biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized crossover trial: effects of wine on inflammatory markers. **Atherosclerosis**, v. 175, n. 1, p. 117-123, 2004.

ETTCHETO, M., PETROV, D., PEDRÓS, I., DE LEMOS, L., PALLÀS, M., ALEGRET, M., LAGUNA, J.C., FOLCH, J. & CAMINS, A. Hypercholesterolemia and neurodegeneration. Comparison of hippocampal phenotypes in LDLr knockout and APPswe/PS1dE9 mice. **Experimental gerontology**, v. 65, p. 69-78, 2015.

EVOLA, M., HALL, A., WALL, T., YOUNG, A., & GRAMMAS, P. Oxidative stress impairs learning and memory in apoE knockout mice. **Pharmacology biochemistry and behavior**, v. 96, n. 2, p. 181-186, 2010.

FERNANDES, I., PÉREZ-GREGORIO, R., SOARES, S., MATEUS, N., & DE FREITAS, V. Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 292, 2017.

FERNÁNDEZ-MAR, M. I., MATEOS, R., GARCÍA-PARRILLA, M. C., PUERTAS, B., & CANTOS-VILLAR, E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 797-813, 2012.

FOTUHI, M., DO, D., & JACK, C. Modifiable factors that alter the size of the hippocampus with ageing. **Nature Reviews Neurology**, v. 8, n. 4, p. 189-202, 2012.

FUHRMAN, B., VOLKOVA, N., COLEMAN, R., & AVIRAM, M. Grape powder polyphenols attenuate atherosclerosis development in apolipoprotein E deficient (E0) mice and reduce macrophage atherogenicity. **The Journal of nutrition**, v. 135, n. 4, p. 722-728, 2005.

GARCÍA-GUZMÁN, J. J., HERNÁNDEZ-ARTIGA, M. P., DE LEÓN, L. P. P., & BELLIDO-MILLA, D. Selective methods for polyphenols and sulphur dioxide determination in wines. **Food chemistry**, v. 182, p. 47-54, 2015.

GLASS, C. K., SAIJO, K., WINNER, B., MARCHETTO, M. C., & GAGE, F. H. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 918-934, 2010.

GOLDSTEIN, J. L., & BROWN, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**, v. 343, n. 6257, p. 425, 1990.

GOMES, A. de M., & KOSZUOSKI, R. Evidências atuais do impacto terapêutico dos inibidores da acetilcolinesterase no transtorno cognitivo leve e na demência vascular. **Revista psiquiátrica Rio Grande do Sul**, v. 27, n. 2, p. 197-205, 2005.

GONÇALVES, M. P., TOMAZ, C., & SANGOI, C. Considerações sobre envelhecimento, memória e atividade física. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 14, n. 2, p. 95-102, 2008.

GROULEFF, J., IRUDAYAM, S. J., SKEBY, K. K., & SCHIØTT, B. The influence of cholesterol on membrane protein structure, function, and dynamics studied by molecular dynamics simulations. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1848, n. 9, p. 1783-1795, 2015.

HANSSON, G. K., & HERMANSSON, A. The immune system in atherosclerosis. **Nature immunology**, v. 12, n. 3, p. 204-212, 2011.

HO, D. J., CALINGASAN, N. Y., WILLE, E., DUMONT, M., & BEAL, M. F. Resveratrol protects against peripheral deficits in a mouse model of Huntington's disease. **Experimental neurology**, v. 225, n. 1, p. 74-84, 2010.

ISHIBASHI, S., BROWN, M. S., GOLDSTEIN, J. L., GERARD, R. D., HAMMER, R. E., & HERZ, J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *Journal of Clinical Investigation*, v. 92, n. 2, p. 883, 1993.

KANG, D. H., YI, C. O., KIM, H., CHOI, C. H., & ROH, G. S. High-fat diet-induced obesity exacerbates kainic acid-induced hippocampal cell death. **BMC neuroscience**, v. 16, n. 1, p. 72, 2015.

KAREGE, F., PERRET, G., BONDOLFI, G., SCHWALD, M., BERTSCHY, G., & AUBRY, J. M. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. **Psychiatry research**, v. 109, n. 2, p. 143-148, 2002.

KERTÉSZ, A., BOMBICZ, M., PRIKSZ, D., BALLA, J., BALLA, G., GESZTELYI, R., VARGAS, B., HAINES, D. D., TOSAKI, A. & JUHASZ, B. Adverse impact of diet-induced hypercholesterolemia on cardiovascular tissue homeostasis in a rabbit model: time-dependent changes in cardiac parameters. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 9, p. 19086-19108, 2013.

KOTHARI, V., LUO, Y., TORNABENE, T., O'NEILL, A. M., GREENE, M. W., GEETHA, T., & BABU, J. R. High fat diet induces brain insulin resistance and cognitive impairment in mice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 2, p. 499-508, 2017.

LEE, B. H., CHOI, S. H., HWANG, S. H., KIM, H. J., LEE, J. H., & NAH, S. Y. Resveratrol inhibits GABAC  $\rho$  receptor-mediated ion currents expressed in xenopus oocytes. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, v. 17, n. 2, p. 175-180, 2013.

LEVIN, H. S. Neuroplasticity following non-penetrating traumatic brain injury. **Brain Injury**, v. 17, n. 8, p. 665-674, 2003.

LI, L., CHEN, X. P., & LI, Y. J. MicroRNA-146a and Human Disease. **Scandinavian journal of immunology**, v. 71, n. 4, p. 227-231, 2010.

LI, Z., YU, X., WANG, Y., SHEN, J., WU, W. K. K., LIANG, J., & FENG, F. By downregulating TIAM1 expression, microRNA-329 suppresses gastric cancer invasion and growth. **Oncotarget**, v. 6, n. 19, p. 17559, 2015.

LIU, G. S., ZHANG, Z. S., YANG, B., & HE, W. Resveratrol attenuates oxidative damage and ameliorates cognitive impairment in the brain of senescence-accelerated mice. **Life sciences**, v. 91, n. 17, p. 872-877, 2012.

LIU, Z., XIAO, B., TANG, B., LI, B., LI, N., ZHU, E., GUO, G., GU, J., ZHUANG, Y., LIU, X., DING, H., ZHAO, X., GUO, H., MAO, X. & ZOU, Q. Up-regulated microRNA-146a negatively modulate Helicobacter pylori-induced inflammatory response in human gastric epithelial cells. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 11, p. 854-863, 2010.

MAILER, R. K., GISTERÅ, A., POLYZOS, K. A., KETELHUTH, D. F., & HANSSON, G. K. Hypercholesterolemia Enhances T Cell Receptor Signaling and Increases the Regulatory T Cell Population. **Scientific Reports**, v. 7, p. 15655, 2017.

MANCINI, G. Colesterol dietético e doença de alzheimer em modelos experimentais: avaliação da resposta sináptica, mitocondrial e comportamental. 118f. 2017. Tese (Doutorado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2017.

MANCINI, G., OLIVEIRA, J., HORT, M. A., MOREIRA, E. L. G., RIBEIRO-DO-VALLE, R. M., ROCHA, J. B. T., & BEM, A. F. Diphenyl diselenide differently modulates cardiovascular redox responses in young adult and middle-aged low-density lipoprotein receptor knockout hypercholesterolemic mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 3, p. 387-397, 2014.

MARKOSKI, M. M., GARAVAGLIA, J., OLIVEIRA, A., OLIVAES, J., & MARCADENTI, A. Molecular Properties of Red Wine Compounds and Cardiometabolic Benefits. **Nutrition and Metabolic Insights**, v. 9, p. 51, 2016.

MARTÍNEZ-LEVY, G. A., & CRUZ-FUENTES, C. S. Genetic and epigenetic regulation of the brain-derived neurotrophic factor in the central nervous system. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 87, n. 2, p. 173, 2014.

MEIRELES, M., MARQUES, C., NORBERTO, S., SANTOS, P., FERNANDES, I., MATEUS, N., FARIA, A. & CALHAU, C. Anthocyanin effects on microglia M1/M2 phenotype: consequence on neuronal fractalkine expression. **Behavioural brain research**, v. 305, p. 223-228, 2016.

MENDES, M. M. P. G., & DE JESUS SOUZA, C. S. A. Aplicação de modelos animais na pesquisa biomédica experimental. **Revista de Saúde da Faciplac**, v. 4, n. 2, 2017.

MOLTENI, R., WU, A., VAYNMAN, S., YING, Z., BARNARD, R. J., & GOMEZ-PINILLA, F. Exercise reverses the harmful effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor. **Neuroscience**, v. 123, n. 2, p. 429-440, 2004.

MOREIRA, E. L. G., DE OLIVEIRA, J., ENGEL, D. F., WALZ, R., DE BEM, A. F., FARINA, M., & PREDIGER, R. D. S. Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: up-regulation of acetylcholinesterase activity as an early and causal event?. **Journal of neural transmission**, v. 121, n. 4, p. 415-426, 2014.

MUKAMAL, K. J., KULLER, L. H., FITZPATRICK, A. L., LONGSTRETH JR, W. T., MITTLEMAN, M. A., & SISCOVICK, D. S. Prospective study of alcohol consumption and risk of dementia in older adults. **Jama**, v. 289, n. 11, p. 1405-1413, 2003.

NEHLIG, A. The neuroprotective effects of cocoa flavanol and its influence on cognitive performance. **British journal of clinical pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 716-727, 2013.

NELSON, D.L., & COX, M.M. Princípios de bioquímica de Lehninger. **Artmed**, 6 ed. 1328f. 2011.

NIIMOTO, T., NAKASA, T., ISHIKAWA, M., OKUHARA, A., IZUMI, B., DEIE, M., SUZUKI, O., ADACHI, N. & OCHI, M. MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 11, n. 1, p. 209, 2010.

NOOYENS, A. C., BUENO-DE-MESQUITA, H. B., VAN GELDER, B. M., VAN BOXTEL, M. P., & VERSCHUREN, W. M. Consumption of alcoholic beverages and cognitive decline at middle age: the Doetinchem Cohort Study. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 4, p. 715-723, 2014.

NUDO, R. Adaptive plasticity in motor cortex: implications for rehabilitation after brain injury. **Journal of Rehabilitation Medicine-Supplements**, v. 41, p. 7-10, 2003.

NUMAKAWA, T., RICHARDS, M., ADACHI, N., KISHI, S., KUNUGI, H., & HASHIDO, K. MicroRNA function and neurotrophin BDNF. **Neurochemistry international**, v. 59, n. 5, p. 551-558, 2011.

O'CONNELL, R. M., KAHN, D., GIBSON, W. S., ROUND, J. L., SCHOLZ, R. L., CHAUDHURI, A. A., KAHN, M., RAO, D. S. & BALTIMORE, D. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 607-619, 2010.

ONO, K., CONDRON, M. M., HO, L., WANG, J., ZHAO, W., PASINETTI, G. M., & TEPLow, D. B. Effects of grape seed-derived polyphenols on amyloid  $\beta$ -protein self-assembly and cytotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 47, p. 32176-32187, 2008.

PALMA, I., CALDAS, A. R., PALMA, I. M., QUEIRÓS, J. A., MADUREIRA, A., OLIVEIRA, J. C., PALMA, P., CORREIA, C. & RAMOS, M. H. LDL-aférese no tratamento de hipercolesterolemia familiar: experiência do Hospital Santo António. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 34, n. 3, p. 163-172, 2015.

PASINETTI, G. M. Novel role of red wine-derived polyphenols in the prevention of Alzheimer's disease dementia and brain pathology: experimental approaches and clinical implications. **Planta medica**, v. 78, n. 15, p. 1614-1619, 2012.

PEDRESCHI, R. & CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.). **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 956-963, 2007.

PFRIEGER, F. W. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 60, n. 6, p. 1158-1171, 2003.

POY, M. N., SPRANGER, M. & STOFFEL, M. microRNAs and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 9, n. s2, p. 67-73, 2007.

PRADO, A. K. M., CAETANO, M. H., BENEDETTI, R., & BENEDETTI, P. D. C. D. Os efeitos do consumo do vinho na saúde humana. **Revista Científica Unilago**, v. 1, n. 1, p. 109-128, 2013.

PREETHI, J., SINGH, H. K., CHARLES, P. D., & RAJAN, K. E. Participation of microRNA 124-CREB pathway: a parallel memory enhancing mechanism of standardised extract of *Bacopa monniera* (BESEB CDRI-08). **Neurochemical research**, v. 37, n. 10, p. 2167-2177, 2012.

PUIG, K. L., FLODEN, A. M., ADHIKARI, R., GOLOVKO, M. Y., & COMBS, C. K. Amyloid precursor protein and proinflammatory changes are regulated in brain and adipose tissue in a murine model of high fat diet-induced obesity. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e30378, 2012.

RAMALINGAM, M., & KIM, S. J.. Reactive oxygen/nitrogen species and their functional correlations in neurodegenerative diseases. **Journal of neural transmission**, v. 119, n. 8, p. 891-910, 2012.



RAMESH, B. N., RAO, T. S., PRAKASAM, A., SAMBAMURTI, K., & RAO, K. S. Neuronutrition and Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 19, n. 4, p. 1123-1139, 2010.

REAGAN-SHAW, S., NIHAL, M., & AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 3, p. 659-661, 2008.

ROBSTAD, N., SÖDERHAMN, U., & FEGRAN, L. Intensive care nurses' experiences of caring for obese intensive care patients: a hermeneutic study. **Journal of clinical nursing**, v. 27, p. 386-395, 2018.

RODRIGO, R., MIRANDA, A. & VERGARA, L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 5, p. 410-424, 2011.

ROESLER, R., GOMES MALTA, L., CARRASCO, L. C., BARATA HOLANDA, R., SOCORRO SOUSA, C. A., & PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, 2007.

ROZZA, A. L., HIRUMA-LIMA, C. A., TANIMOTO, A., & PELLIZZON, C. H. Morphologic and pharmacological investigations in the epicatechin gastroprotective effect. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

SÁ, C. G., FREITAS, R. M., & FEITOSA, C. M. Efeito do tratamento agudo do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck na aquisição da memória espacial de ratos avaliada no labirinto aquático de Morris. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 2, p. 211-215, 2012.

SAHU, S. S., MADHYASTHA, S., & RAO, G. M. Neuroprotective effect of resveratrol against prenatal stress induced cognitive impairment and possible involvement of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 103, n. 3, p. 520-525, 2013.

SARCHIELLI, E., MORELLI, A., GUARNIERI, G., IORIZZI, M., & SGAMBATI, E. Neuroprotective effects of quercetin 4'-O-β-d-diglycoside on human striatal precursor cells in nutrient deprivation condition. **Acta Histochemica**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.01.003>

SIES, H. Polyphenols and health: update and perspectives. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, n. 1, p. 2-5, 2010.

SMID, S. D., MAAG, J. L., & MUSGRAVE, I. F. Dietary polyphenol-derived protection against neurotoxic  $\beta$ -amyloid protein: from molecular to clinical. **Food & function**, v. 3, n. 12, p. 1242-1250, 2012.

SMOLIGA, J. M., BAUR, J. A., & HAUSENBLAS, H. A. Resveratrol and health - A comprehensive review of human clinical trials. **Molecular nutrition & food research**, v. 55, n. 8, p. 1129-1141, 2011.

SOKOLOV, A. N., PAVLOVA, M. A., KLOSTERHALFEN, S., & ENCK, P. Chocolate and the brain: neurobiological impact of cocoa flavanols on cognition and behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 10, p. 2445-2453, 2013.

STANNER, S. A., HUGHES, J., KELLY, C. N. M., & BUTTRISS, J. A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'. **Public health nutrition**, v. 7, n. 3, p. 407-422, 2004.

STRINGER, T. P., GUERRIERI, D., VIVAR, C., & VAN PRAAG, H. Plant-derived flavanol (-) epicatechin mitigates anxiety in association with elevated hippocampal monoamine and BDNF levels, but does not influence pattern separation in mice. **Translational psychiatry**, v. 5, n. 1, p. e493, 2015.

SUSIN, C. T. Dinâmica estratégica da vinícola Miolo Ltda. e o Vale dos Vinhedos. **Dissertação de mestrado**. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

TALAVÉRA, S., FELGINES, C., TEXIER, O., BESSON, C., GIL-IZQUIERDO, A., LAMAISON, J. L., & RÉMÉSY, C. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 10, p. 3902-3908, 2005.

THIRUMANGALAKUDI, L., PRAKASAM, A., ZHANG, R., BIMONTE-NELSON, H., SAMBAMURTI, K., KINDY, M. S., & BHAT, N. R. High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. **Journal of neurochemistry**, v. 106, n. 1, p. 475-485, 2008.

TIWARI, V., & KHOKHAR, M. Mechanism of action of anti-hypercholesterolemia drugs and their resistance. **European journal of pharmacology**, v. 741, p. 156-170, 2014.

TOMAZETTI, T. C., ROSSAROLLA, M. D., ZEIST, A. R., GIACOBBO, C. L., WELTER, L. J., & ALBERTO, C. M. Fenologia e acúmulo térmico em videiras viníferas na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 11, p. 1033-1041, 2015.

TONIETTO, J., MADELLI, F., ZANUS, M. C., GUERRA, C. C., & PEREIRA, G. E. O clima vitícola das regiões produtoras de uva para vinhos finos do Brasil. **Clima, zonificación y tipicidad del vino en regiones vitivinícolas Iberoamericanas**. Cytel, Madrid, p. 111-146, 2012.

TRAILL, W. B., MAZZOCCHI, M., SHANKAR, B., & HALLAM, D. Importance of government policies and other influences in transforming global diets. **Nutrition reviews**, v. 72, n. 9, p. 591-604, 2014.

ULLRICH, C., PIRCHL, M., & HUMPEL, C. Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 45, n. 4, p. 408-417, 2010.

VERMEHREN-SCHMAEDICK, A., KHANJIAN, R. A., & BALKOWIEC, A. Cellular mechanisms of activity-dependent BDNF expression in primary sensory neurons. **Neuroscience**, v. 310, p. 665-673, 2015.

VEZZANI, A., FUJINAMI, R. S., WHITE, H. S., PREUX, P. M., BLÜMCKE, I., SANDER, J. W., & LÖSCHER, W. Infections, inflammation and epilepsy. **Acta neuropathologica**, v. 131, n. 2, p. 211-234, 2016.

VIRGILI, M. & CONTESTABILE, A. Partial neuroprotection of in vivo excitotoxic brain damage by chronic administration of the red wine antioxidant agent, trans-resveratrol in rats. **Neuroscience letters**, v. 281, n. 2, p. 123-126, 2000.

WALLERATH, T., DECKERT, G., TERNES, T., ANDERSON, H., LI, H., WITTE, K., & FÖRSTERMANN, U. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances

expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. **Circulation**, v. 106, n. 13, p. 1652-1658, 2002.

WANG, G., CHEN, L., PAN, X., CHEN, J., WANG, L., WANG, W., CHENG, R., WU, F., FENG, X., YU, Y., ZHANG, H. T., O'DONNELL, J. M. & XU, Y. The effect of resveratrol on beta amyloid-induced memory impairment involves inhibition of phosphodiesterase-4 related signaling. **Oncotarget**, v. 7, n. 14, p. 17380, 2016.

WEBER, C., & NOELS, H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. **Nature medicine**, v. 17, n. 11, p. 1410-1422, 2011.

WHYTE, A. R., & WILLIAMS, C. M. Effects of a single dose of a flavonoid-rich blueberry drink on memory in 8 to 10 y old children. **Nutrition**, v. 31, n. 3, p. 531-534, 2015.

WIELOCH, T., & NIKOLICH, K. Mechanisms of neural plasticity following brain injury. **Current opinion in neurobiology**, v. 16, n. 3, p. 258-264, 2006.

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

WYSS-CORAY, T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response?. **Nature medicine**, v. 12, n. 9, p. 1005-1015, 2006.

XAVIER, H. T., IZAR, M. C., FARIA NETO, J. R., ASSAD, M. H., ROCHA, V. Z., SPOSITO, FONSECA F. A., DOS SANTOS J. E., SANTOS R. D., BERTOLAMI M. C., FALUDI A. A., MARTINEZ T. L. R., DIAMENT J., GUIMARÃES A., FORTI N. A., MORIGUCHI E., CHAGAS A. C. P., COELHO O. R. & RAMIRES J. A. F. V Diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 101, n. 4, p. 1-20, 2013.

XIANG, L., XIAO, L., WANG, Y., LI, H., HUANG, Z., & HE, X. Health benefits of wine: Don't expect resveratrol too much. **Food chemistry**, v. 156, p. 258-263, 2014.

XU, Y., KU, B., TIE, L., YAO, H., JIANG, W., MA, X., & LI, X. Curcumin reverses the effects of chronic stress on behavior, the HPA axis, BDNF expression and phosphorylation of CREB. **Brain research**, v. 1122, n. 1, p. 56-64, 2006.

YI, L. T., LI, J., LIU, B. B., LUO, L., LIU, Q., & GENG, D. BDNF–ERK–CREB signalling mediates the role of miR-132 in the regulation of the effects of oleanolic acid in male mice. **Journal of psychiatry & neuroscience: JPN**, v. 39, n. 5, p. 348, 2014.

YILMAZ, Y. & TOLEDO, R. T. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 2, p. 255, 2004.

ZADELAAR, S., KLEEMANN, R., VERSCHUREN, L., DE VRIES-VAN DER WEIJ, J., VAN DER HOORN, J., PRINCEN, H. M., & KOOISTRA, T. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 27, n. 8, p. 1706-1721, 2007.

ZAGREBELSKY, M. & KORTE, M. Form follows function: BDNF and its involvement in sculpting the function and structure of synapses. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 628-638, 2014.

ZHAO, Y. N., LI, W. F., LI, F., ZHANG, Z., DAI, Y. D., XU, A. L., QI, C., GOA, J. M. & GAO, J. Resveratrol improves learning and memory in normally aged mice through microRNA-CREB pathway. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 435, n. 4, p. 597-602, 2013.

## 9 ANEXO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)



Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA  
Fone: (55)3911-0200, E-mail: [ceua@unipampa.edu.br](mailto:ceua@unipampa.edu.br)

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 034/2017 - ADENDO

Título: Investigação da via das quinureninas em um modelo de Encefalomielite autoimune experimental em camundongos.

Data da aprovação: 09/08/2017

Período de vigência do projeto: 09/08/2019

Pesquisadores(a): Cristiano Ricardo Jesse

Campus: Itaqui

Telefone: (55) 99923-8767

E-mail: [cristianoricardojesse@yahoo.com.br](mailto:cristianoricardojesse@yahoo.com.br)

# CEUA

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongos C57BL/6
Nº de animais	40 + 40 (acrécimo)
Peso/Idade	20 – 22 g / 18 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério da Universidade Federal de Pelotas

  
Prof. Dr. Vanusa Manfredini  
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA